Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange

Von Karl Höfler
Korr. Mitglied der Österr. Akademie der Wissenschaften
(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 11 Textabbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung am 11. Dez. 1947)

Ernst Küster zum 70. Geburtstag

Inhalt.

I. Einleitung und Methodik.

Seit Küster die Cytomorphologie zur Disziplin erhoben und das Studium der kranken und nekrotischen Zelle als gleichwertiges Arbeitsziel neben das der normalen gesetzt hat, gewinnen die Bestrebungen, lebende und tote Teile des Protoplasten färberisch zu differenzieren, neuen Inhalt. Die Versuche, durch Anwendung von Farbgemischen lebend und tot, gesund und krank in der Zelle zu unterscheiden, reichen weit zurück (Rhumbler 1893, Růžička 1904, Becquerel 1923, Lepeschkin 1925, 1937). Küster (1942) hat die Ergebnisse all dieser Mischfärbeversuche besprochen

und neuerlich vital differenzierende Färbungen mit Neutralrot-Methylenblau-Gemischen erfolgreich an pflanzlichen Zellen durchgeführt. Sonst hat man in jüngerer Zeit Einfachfärbungen vorgezogen und den metachromatischen Farbstoffen besonderes Augenmerk zugewandt.

Nun hat Haitinger (1933 f, 1938) durch die Begründung der Fluorochromierungstechnik der Vitalfärbung neue Wege gewiesen. Schon Döring (1935), der als erster die Fluoreszenzmikroskopie im Dienste eigentlich zellphysiologischer Fragestellung anwandte, hebt die Vorteile der Möglichkeit, mit äußerst verdünnten Lösungen zu arbeiten, hervor. Im UV-Licht werden die in geringster Konzentration aufgenommenen Farbstoffe in der Zelle sichtbar. In Struggers Händen hat sich seither die Methode solcher wirklich „inturbanter" Vitalfärbung mit Fluorochromen bewährt. Er hat uns im Akridinorange einen Farbstoff kennen gelehrt, der alle wesentlichen Bestandteile der Zelle anzufärben vermag. Vielleicht ist dieser Farbstoff berufen, sich unter den Fluoreszenzfarbstoffen einen ebenso bevorzugten Platz zu erobern, wie er dem Neutralrot (Küster 1898) seit Jahrzehnten in der Hellfeldmikroskopie zukommt.

Ich versuche im folgenden, dieses vielfarbige Fluorochrom zur Kennzeichnung von Nekrosen anzuwenden und so mit einem Farbstoff das zu erreichen, wozu vordem Farbstoffgemische verwendet wurden. Probleme der Permeabilität und Stoffspeicherung standen für mich diesmal primär nicht im Vordergrund, doch bin ich den Fragen vom Anfang an auch nicht grundsätzlich aus dem Wege gegangen; ja im Kapitel über die Einwirkung von Ammoniak auf lebendgefärbte Zellen werde ich Beobachtungen mitteilen, die mir (1947, S. 21) den Schlüssel zur späteren Klärung einer wichtigen allgemeinen Frage, die Wirkung basischer Vitalfarbstoffe betreffend, gegeben haben.

Über die Eigenschaften des Farbstoffes ist aus Struggers Untersuchungen schon viel bekannt. Das Akridinorange ist ein leicht wasserlöslicher, basischer Farbstoff und als solcher im sauren Bereich dissoziiert. Bei p_H 2,04—6,48 wandert nach Strugger (1940, S. 105) das gefärbte Kation im Gleichstromfeld zur Kathode, wo stets ein deutlicher Anstieg, verbunden mit Farbstoffansammlung wahrzunehmen ist; bei p_H 7,10 und 7,40 ist der Anstieg nicht zu merken, die Ansammlung an der Kathode stark geschwächt. Mit KOH alkalinisierte Farblösung zeigt keinen Unterschied zwischen Anode und Kathode. Strugger schließt daraus, daß der Farbstoff jetzt in molekularer, nicht ionisierter Form vorliegt, die Fluoreszenzfärbung der Lösung ist ein leuchtendes Gelb-

grün. — Mit den Farbkationen färben sich die Zellulosewände der Zwiebelinnenepidermis stark an, da die Zellmembranen, die oberhalb ihres IEP[1] (nach D r a w e r t um p_H 3,0) negativ aufgeladen sind, die Kationen elektroadsorptiv festlegen; unter dem IEP, wo Zellwände und Farblösung gleichsinnig geladen sind, erfolgt bloße Durchtränkung der intermizellaren Hohlräume und schwache „Imbibitionsfärbung“ (S t r u g g e r 1940, S. 113).

In seiner ionisierten Form gibt das Akridinorange den sog. „K o n z e n t r a t i o n s e f f e k t“. Es fluoresziert, wie S t r u g g e r zeigte, in schwachen Konzentrationen grün, in mittleren gelb, in starken kupferrot. Ein solcher Farbwechsel mit der Konzentration beweist, daß Kationen vorliegen. Vielleicht läßt sich die Verschiebung des Schwerpunktes des Fluoreszenzspektrums auf Grund der Forschungen S c h e i b e s (1938—1941) an verschiedenen organischen Farbstoffen als eine konzentrationsbedingte, reversibel verlaufende Polymerisation der Farbkationen deuten; freilich scheint das Akridinorange in dieser Richtung noch nicht untersucht worden zu sein. — Auf den Konzentrationseffekt gründet S t r u g g e r (1940—1942) seine Methode zur Unterscheidung lebender und toter Protoplasten. Lebende färben sich mit Akridinorange grün, tote aber rot. Das lebende Plasmaeiweiß vermag nach S t r u g g e r nur wenig, das tote aber große Mengen der Farbstoffkationen elektroadsorptiv zu binden.

Die undissoziierten, elektrisch neutralen Moleküle des Akridinoranges sind lipoidlöslich und p e r m e i e r e n leicht durch das lebende Plasma bis in den Zellsaft. Dem ionisierten Anteil des Farbstoffes ist der Durchtritt versperrt. Es ist einer der theoretisch und experimentell bestfundierten Sätze der Permeabilitätslehre, daß bei Verbindungen verschiedener Stoffklassen (Alkaloide, Farbstoffe) Moleküle permeieren, Ionen aber nicht.

Nachdem sich Hunderte von Arbeiten mit der Vitalfärbung durch basische Farbstoffe befaßt hatten, haben erstmalig C o l l a n d e r, L ö n e g r e n und A r h i m o (1943) das Permeiervermögen einer Farbbase q u a n t i t a t i v untersucht. Das Neutralrot permeiert durch das Plasma von Allium-Außenepidermiszellen etwa 20.000mal schneller als der Harnstoff — seine Permeationskonstante P′ liegt um 1800 —, in Internodialzellen von *Chara ceratophylla* und *Tolypellopsis stelligera* m e h r als 140- bzw. 800mal schneller als der Harnstoff. Sollte das Permeationsvermögen der Akridinorangemoleküle von ähnlicher Größenordnung sein, so wird unmittelbar klar, daß die Moleküle den

[1] Isoelektrischer Punkt (besser „Entladungspunkt“, vgl. H ö f l e r 1946).

ganzen Protoplasten, man möchte sagen, widerstandslos durchdringen und nach dem Prinzip der Konkurrenz dort in der Zelle gespeichert werden, wo stärkste adsorptive oder chemische Bindungsmöglichkeiten sie festhalten. Dagegen ist für den Nichtdurchtritt des ionisierten Farbstoffs der Permeationswiderstand des Gesamtprotoplasmas bestimmend, die Permeabilität ist hier also begrenzender Faktor. Wir werden der Speicherkonkurrenz bei der Kennzeichnung der Färbebilder und Nekrosen unser besonderes Augenmerk zuwenden.

Methodisch bin ich nach Strugger vom Reihenversuch mit Lösungen abgestufter p_H-Werte ausgegangen. Der Farbstoff war gleicher Herkunft wie der von Strugger verwendete (Akridinorange von Hollborn u. Söhne, Leipzig, standardisiert). Bukatsch und Haitinger (1940) haben mit einem Präparat anderer Herkunft (Akridinorange NO) gearbeitet. Die Farblösungen wurden in der üblichen Weise mit Phosphatpuffern hergestellt (vgl. Strugger 1938 a, Drawert 1937 a), die Objekte 10—15 Minuten in den gepufferten Farbstofflösungen 1 : 10.000 belassen, dann im ungefärbten Phosphatpuffer von gleichem oder fast gleichem p_H ausgewaschen und darin im UV-Licht untersucht. — Die p_H-Werte der zu verschiedener Zeit in gleicher Weise hergestellten Lösungen unterliegen bekanntlich, je nach dem CO_2-Gehalt des dest. H_2O usw., kleinen Schwankungen. Zur p_H-Messung stand mir in meinem Institut ein Lautenschläger-Ionometer mit Chinhydronelektroden zur Verfügung; er erlaubt Messungen bis um p_H 7,5, versagt aber im alkalischen Bereich. Meist habe ich genaueste p_H-Bestimmungen im folgenden auch nicht gebraucht.

Ich arbeitete gewöhnlich mit Mischungsreihen aus primärem und tertiärem Phosphat, deren Zusammensetzung aus der Tabelle hervorgeht.

	n/10 HCl	KH_2PO_4	Na_3PO_4	p_H ungefärbt	p_H Farblösung
I	9,5	0,5		2,10	1,97
II	0,5	9,5		3,48	3,35
III		10,0		4,95	4,88
IV		9,5	0,5	6,06	6,03
V		9,0	1,0	6,38	6,35
VI		7,0	3,0	7,10	7,13
VII		6,0	4,0	7,50	7,44
VIII		5,0	5,0		8,00
IX		4,5	5,5		8,75
X		4,0	6,0	10,25	10,05
XI		3,0	7,0	$>$ 10,45	$>$ 10,15

Genaue p_H-Werte mit Corning-Glaselektroden und dem Lautenschlägerschen Ultrainographen hat mir Herr Dr. H. Mikschik im biochemischen Institut der Technischen Hochschule (Prof. Janke) in dankenswerter Weise bestimmt. Sie beziehen sich auf die im Reihenversuch am 7. Juli verwendeten Lösungen. Diese Werte sind in der folgenden Tabelle an-

gegeben. — Die sonstigen p_H-Angaben des folgenden Textes besagen im allgemeinen nur, daß in der gleichen Weise bereitete Lösungen von annähernd gleichem p_H verwendet worden sind.

Die Phosphat-Stammlösungen waren wie üblich $^1/_{15}$ molar. Das Puffergemisch wurde zum Gebrauch mit 9 Teilen bidest. H_2O verdünnt (farbloser Puffer) oder mit 8 Teilen H_2O und 1 Teil Farblösung 1 : 1000 in H_2O. Erwähnt sei noch, daß die Ausgangsphosphatlösungen nicht volum-, sondern gewichtsnormal (also 250 cm^3 H_2O + x Gramm Salz) hergestellt wurden. Dies geschah der Einheitlichkeit halber, denn ebenso bereitete Lösungen hatte Frau Dr. I. Krauß seit 2 Jahren bei ihren Vitalfärbungsversuchen benützt.

Bei der auf S. 605 mitzuteilenden cH-Feinreihe gebrauchte ich Puffer aus primärem und sekundärem Phosphat und stellte darin die Farblösungen 1 : 10.000 in der beschriebenen Weise her.

KH_2PO_4	Na_2HPO_4	p_H ungefärbt	p_H Farblösung
9	1	5,92	5,92
8	2	6,20	6,28
7	3	6,45	6,48
6	4	6,60	6,68
5	5	6,75	6,85
4	6	6,95	6,96

Die relative Unschädlichkeit der Akridinorangefärbung geht auch daraus hervor, daß die Permeabilität vitalgefärbter Zellen verschiedener Objekte für Harnstoff und Glyzerin fast unverändert bleiben kann. Nähere Angaben darüber sollen an anderem Orte folgen. — Vgl. Hofmeister 1938.

Seit dem Frühjahr 1943 besaß ich im Institut die große Zeißsche Fluoreszenzapparatur und das neue Reichertsche Fluoreszenzmikroskop Lux UV. Mit diesem wurden von März bis Juli 1944 die folgenden Versuche durchgeführt. Die Zwiebeln waren in meinem Versuchsgarten im Wiener Augarten kultiviert und kalt und frostfrei gelagert; sie waren anthokyanfrei (Zellsaft-Anthokyan absorbiert das kurzwellige Licht und löscht die Fluoreszenz). Im Sommer gebrauchte ich den Rest vorjähriger Zwiebeln, die noch in Ruhe oder höchstens trocken ein wenig ausgetrieben waren. Dabei scheinen sich die plasmatischen Eigenschaften nicht oder doch viel weniger zu ändern als beim Antreiben der Zwiebeln auf Wasser. Über den Wandel, den hiebei die Protoplaste erfahren, liegen zahlreiche wertvolle zellphysiologische Angaben vor, die der Synthese harren (vgl. zumal die Arbeiten von Strugger, Drawert, Houska).

Die Lebermoose, im März untersucht, waren seit dem Spätherbst in Glasdosen zwischen Nordfenstern des Instituts kultiviert und in bestem Zustand. *Calypogeia sphagnicola* war am 24. Oktober 1943 im Hochmoor Seelohe im Fichtelgebirge gesammelt. *Chilo-*

scyphus pallescens stammte aus Golling-Torren (vgl. Herzog u. Höfler) und war von mir dort 1942 und 1943 in anderer Richtung untersucht worden.

Alle Zeichnungen hat Herr Dozent Dr. H. Schindler während eines Fronturlaubes im Juni und anfangs Juli 1944 hergestellt, wofür ich ihm herzlichen Dank sage. Bei der technischen Vorbereitung der Versuche hat mich meine Schülerin Frau Doktor E. Pecksieder treulich unterstützt. Frau Doz. Dr. L. Reuter bin ich für mannigfache Mithilfe zu aufrichtigem Dank verbunden.

II. Versuche an Lebermoosen.

Bei der Wahl der Objekte und der zu prüfenden Nekroseformen habe ich mir Beschränkung auferlegt.

Seit einigen Jahren (Höfler 1942, 1943, 1946) hatte ich mich mit der Austrocknungsfähigkeit des Protoplasmas beschäftigt und an zahlreichen Lebermoosen in Dampfkammern abgestufter Luftfeuchtigkeit über H_2SO_4 die kritischen Austrocknungsgrenzen bestimmt. Sie liegen für die einzelnen Lebermoosarten verschieden und sind kennzeichnend für jede Spezies. Sie verteilen sich über den ganzen Bereich von 95% bis < 1% relat. Luftfeuchtigkeit.

In den Exsikkatorkammern, deren rel. F. unter der Lebensgrenze liegt, sterben die Zellen ab. Die Nekroseformen der durch Trockenheit getöteten Zellen sind höchst charakteristisch. Wesentlich ist, daß es nicht eine typische Form der Trockennekrose gibt, sondern daß die Formen cytomorphologisch recht mannigfaltig sind. Für Laubmoos- und Rotkrautzellen hat Iljin (1932/33), für viele andere Anthophytenzellen hat Etz (1939) schon solche Formen beschrieben. Ich habe etwa 80 Lebermoosarten untersucht. Bei einer Art, ja in den Zellen desselben durch Trocknung geschädigten oder getöteten Blättchens, finden sich gewöhnlich mehrere wohlunterschiedene Nekrosebilder. Der Trockentod erfolgt anders knapp über der kritischen Grenze, anders beim jähen Eintrocknen über höheren H_2SO_4-Konzentrationen. Der Vergleich verschiedener Arten ergibt eine noch viel größere Mannigfaltigkeit. Leicht läßt sich erkennen, daß nicht jede Nekroseform bei jedem Moos auftritt, sondern daß meist bei einer Art einige Nekrosen typisch sind. Das morphologische Geschehen bei der Trockennekrose ist für die einzelnen Arten in gewissen Grenzen reproduzierbar. Die Absterbebilder sind daher auch geeignet, unterscheidende plasmatische Artcharaktere abzugeben.

Trotzdem wiederholen sich gewisse Grundtypen der Nekrosebilder auch bei verschiedenen Arten:

1. Schrumpfnekrosen. Sehr häufig finden sich in den durch Lufttrockenheit getöteten Lebermooszellen, die nachher in Wasser untersucht werden, geschrumpfte, rings von der Zellwand abgehobene Protoplasten. Sie sind rundlich, eckig oder unregelmäßig konvex konturiert und sowohl dadurch wie durch das

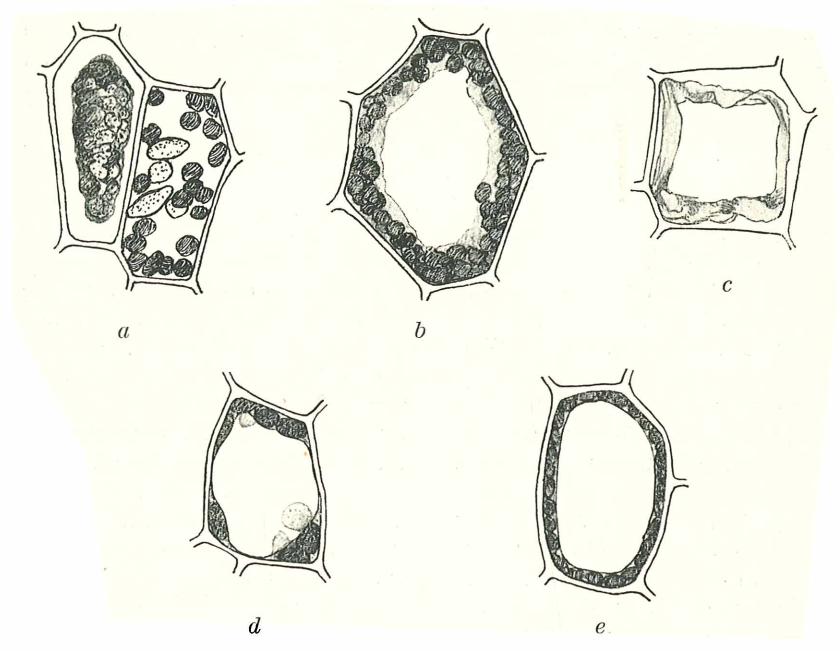


Abb. 1. Trockennekrose bei Lebermoosen: *a* Schrumpfnekrose, daneben normale Zelle mit Ölkörperchen (*Aplozia riparia*, 24 Stunden über 32% H_2SO_4, rel. Feuchtigkeit 71%, getrocknet, dann im Dampfraum aufgeweicht), *b* Kranznekrose (*Calypogeia Neesiana*, wie vor.), *c* Rahmennekrose (*Lepidozia reptans*, alte natürliche Nekrose, 24 Stunden getrocknet bei 26% rel. F.), *d* Saumnekrose, Tonoplast und Zellsaft erhalten (*Aplozia riparia*, wie oben), *e* Saumnekrose (*Lepidozia reptans*, 24 Stunden bei 26% rel. F.).

deutlich koagulierte Aussehen des freigelegten Plasmas auf den ersten Blick von echter Plasmolyse unterschieden[2]. Das Stämmchen von *Aplozia riparia*, dem die in Abb. 1 *a* abgebildeten Blattzellen angehörten, war in der kritischen Dampfkammer von 71% rel. F.

[2] Phot. bei Höfler 1943, S. 310 (Plagiochila asplenioides). — Schrumpfnekrosen ausgetrockneter Hefezellen hat Lepeschkin (1943, S. 409) beschrieben und abgebildet.

24 Stunden getrocknet, dann in dampfgesättigter Luft aufgeweicht worden und wurde in Wasser liegend beobachtet. Die benachbarte Zelle war am Leben geblieben und hat ihre Ölkörperchen unversehrt erhalten, die in den nekrotischen Zellen, von wenig Ausnahmen abgesehen, verschwinden.

2. Kranznekrose. Das getötete Plasma mit den Chloroplasten liegt der Zellwand ringsum an. Der mittlere Teil der Zelle bleibt frei und erscheint als farbloses Feld. Die Chloroplasten liegen in einer oder mehreren Reihen, sind braungrün oder geschwärzt, aber nicht zerfallen oder verklebt. An der Grenze des Wandplasmas gegen das Mittelfeld erkennt man einen deutlichen Saum koagulierten Cytoplasmas, der sich nach innen scharf absetzt (Abb. 1 *b*). — Die Kranznekrose ist charakteristisch für mehrere *Calypogeia*-Arten (*C. Neesiana, sphagnicola, fissa*), sie fehlt dort in keinem Reihenversuch und findet sich in den meisten toten Zellen.

3. Rahmennekrose. Ich bezeichne so ein spätes Nekrosebild, Abb. 1 *c*, das sich auch in Blättchen, die am natürlichen Standort in Trockenzeiten partiell getötet sind, in exponiert gelegenen Zellen findet. Vom ganzen Plasmaschlauch ist nur ein relativ dünner, zum Ring geschlossener, etwas knitteriger Wulst übriggeblieben, der meist farblos ist, von Inhaltskörpern nichts mehr erkennen läßt und in gewissem Abstand den Zellwänden entlang verläuft.

4. Saumnekrose. Der Plasmaschlauch mit den Plastiden liegt als enger Saum der Zellwand fest angepreßt an. Von den früheren Formen ist diese Nekrose (Abb. 1 *d*, *e*) dadurch verschieden, daß der Tonoplast erhalten und der Zellsaft nicht ausgeronnen ist. Jener preßt, wenn die Zelle in Wasser liegt, durch seine osmotische Spannung das degenerierende Plasma gegen die Zellmembran. Die Chloroplasten sind fast unverändert grün oder gebräunt, die Ölkörper meist ganz verschwunden. Das freie, farblose Mittelfeld ist sehr groß, größer als bei der Kranznekrose, und von der glatten Kontur der Vakuolenhülle umgrenzt. Solche Saumnekrosen finden sich gewöhnlich einzeln eingestreut im Grenzbereich zwischen lebenden und toten Zellfeldern, entstehen in denjenigen Stufen relativer Luftfeuchtigkeit, die wenig über der kritischen Grenze liegen, und sind bei einfacher mikroskopischer Beobachtung nicht immer leicht zu erkennen.

Nachträgliche Spontankontraktion der die Austrocknung überdauernden, in Wasser liegenden Tonoplasten zu Kugeln ist in Lebermooszellen ziemlich selten, ließ sich aber doch bei *Metzgeria conjugata* und bei mehreren anderen thallösen und einigen foliösen Arten in einzelnen Zellen beobachten. —

Durch Fluorochromfärbung werden nun alle die Bilder außerordentlich geklärt. Nekroseformen, die, im selben Blättchen liegend, sonst nur bei sorgsamer mikroskopischer Durchmusterung unterschieden werden können, sind im UV-Licht schon im Übersichtsbild ganz unmittelbar kenntlich.

Die meisten Lebermoose zeigen freilich eine recht lebhafte Eigenfluoreszenz, die an frischen und an vorgetrockneten, aber ungefärbten Blättern kontrolliert werden muß. Darüber hat Frau Dr. I. Krauß in einer noch unveröffentlichten Vitalfärbungsstudie ausführlich berichtet. Die Membranen vieler foliöser Arten leuchten hellblau, die Chloroplasten zartrosa, auch die Zellsäfte enthalten oft fluoreszierende Stoffe. Die Untersuchung wird dadurch schwieriger als bei an sich fluoreszenzfreien Objekten (wie dem Parenchym von Küchenzwiebel und Rettich).

Bei *Calypogeia sphagnicola,* die ich als Versuchspflanze wählte, leuchten die Zellsäfte im UV-Licht primär schön himmelblau, die roten Chlorophyllkörner stören die Beobachtung wenig. Der kritische Austrocknungsgrenzwert des Materials lag bei 81% rel. F. Hier waren viele Blättchen halb lebend, halb tot; oft war etwa die vordere Hälfte der Blattfläche und die einsäumende Zellreihe getötet, die innere basale Fläche am Leben. Nach 1—2tägigem Aufenthalt in Luft von 88% rel. F. lebten fast alle Zellen, nach solchem bei 71% rel. F. nur ganz vereinzelte Zellen.

Ich färbte 10 Minuten mit Akridinorange 1 : 10.000, p_H 4,4, 6,3 und 8,0, und untersuchte in den farblosen Phosphatpuffern. Die schönsten Bilder liefert das alkalische Farbbad. Die Zellen der lebenden Felder sind in der Fläche himmelblau (primäre Fluoreszenz). Die toten Zellfelder (Kranznekrosen) sind, da die Zellsäfte ausgeflossen sind, dunkel und optisch leer. Einzelne tote Zellen im lebenden Feld erscheinen als dunkle Augen in der blauen Fläche. Die Zellwände sind (primär) himmelblau, im lebenden Areal aber meist zartrosa gefärbt, im toten Blatteil sind sie schwächer blau; in einem Teil des Blattes leuchten sie weißlich, und diese Fluorochromfärbung hört genau an der Grenze des lebenden und nekrotischen Blattfeldes auf.

In einem bestimmten zur Beobachtung gewählten Blättchen ist das lebende Blattfeld vom toten ziemlich scharf abgegrenzt. Interessant sind die nekrobiotischen Protoplaste, die am Übergang liegen. Ihr Vakuoleninhalt fluoresziert ziemlich grell hellgelb, gelbgrau bis grau. Vereinzelte gleiche Zellen liegen auch im toten Areal. Auf Weißlicht bei starker Vergrößerung umgestellt, zeigen jene noch Chloroplasten und zerfallende Ölkörper. Sie sind noch turgeszent, nicht wie die toten Nachbarn ent-

spannt. Auch alle turgeszent überlebenden Zellen im toten Feld leuchten noch hellgelb, auch wenn die Ölkörperchen schon zerstört sind. Wo größere Gruppen solcher nekrotischer gelbgrauer Zellen an lebende, zart himmelblaue grenzen, hört die gelbweiße Membranfärbung genau vor den nekrotischen Zellen auf; diese entziehen wohl den Zellwänden den Farbstoff und speichern ihn in der Vakuole.

Bei p_H 4,4 ist das Färbungsbild im übrigen ähnlich, doch fehlen die gelben Übergangszellen zwischen dem dunklen toten und dem lebenden Blattfeld. Himmelblaue und leere Zellflächen grenzen unvermittelt aneinander. Die eigentlich nekrotischen Stadien sind also nur in der alkalischen Lösung färberisch differenziert, nicht in der sauren. — Die Zellwände der Rhizoiden sind in allen drei c_H-Lagen im UV leuchtend rot gefärbt (vgl. Kressin 1935). Es handelt sich vielleicht um chemische Niederschlagsfärbung (Drawert 1937, S. 109) in den Membranen.

Chiloscyphus pallescens. Die kritisch-letale Trockengrenze des Materials liegt um 71% rel. F. Die oberen Blätter des Stämmchens sind gegen die Austrocknung widerstandsfähiger als die unteren. Die Resistenz nimmt mit der Insertionshöhe stetig ab. Ich hatte die Gradienten am frischen Material in Golling 1942 und 1943 ausführlich untersucht. — Im Stämmchen, das 46 Stunden bei 81% rel. F. getrocknet worden war, lebt vor der Fluorochromierung noch alles, nach dem Farbbad (p_H um 8,3) sind im UV-Licht die Vakuolen himmelblau geblieben wie bei primärer Fluoreszenz, die dünnen Plasmaschläuche erscheinen farblos mit zartrosa Chloroplasten, die Zellwände orange. Nur die Saumzellen des Blattes scheinen die Behandlung schlecht vertragen zu haben, sie sind teils dunkel kupferrot (tot), teils grell grüngelb. Die Rhizoiden leuchten wieder rot.

Das Stämmchen aus der kritischen Dampfkammer von 71% rel. F., 46 Stunden im Thermostaten getrocknet und 4 Stunden in dampfgesättigter Luft aufgeweicht, gibt nach dem Färben und Waschen ein schönes, buntes Fluoreszenzbild. Das oberste entfaltete Blättchen zeigt bei schwacher Vergrößerung im UV-Licht fünferlei Zellen; sie sind 1. himmelblau, 2. rosa, 3. grell gelbgrün leuchtend, 4. schokolade-schwarzbraun; hierzu kommen 5. kupferrot leuchtende tote Zellen am Blattsaum. — Individuelle Zellen werden im Hellfeld durchmustert. Die Zellen der durch Übergänge verbundenen Typen 1 und 2 haben Ölkörper und kleine Plastiden, sie leben, nur die Zellwände sind schwächer oder stärker orangerosa angefärbt. Die Zellen mit grellgelbem Vakuoleninhalt liegen in kleinen Gruppen und heben sich im UV-Licht gegen die mattblauen scharf ab. Im Hellfeld

sind sie teils wenig von den normalen verschieden, teils zeigen sie Saumnekrosen bzw. Tonoplastenstadien. Die Ölkörper sind noch vorhanden oder im Zerfall begriffen. Die schokoladeschwarzen Zellen vom Typ 4 erweisen sich im Hellfeld als tot, sie sind nicht turgeszent, die Wände werden von den lebenden Nachbarn leicht eingedellt. Es handelt sich um eine spezielle Nekroseform der Gattungen *Chiloscyphus* und *Lophocolea*, die ich (1943, S. 104) schon beschrieben habe. Im Cytoplasma fällt postmortal ein brauner Körper noch unbekannter chemischer Natur aus, der oft auch in den Zellsaft übertritt. Dieser wirkt im UV-Licht fluoreszenzlöschend und bedingt, auch wo er im Hellfeld nur leicht bräunt, die oft schwarzbraune Färbung der Zellinhalte im UV-Licht. Die grellroten Saumzellen vom Typ 5 zeigen im Weißlicht Schrumpfnekrose und gelbe postmortale Anfärbung.

Die Stämmchen von *Chiloscyphus pallescens* zeigen, wie erwähnt, einen Gradienten abnehmender Trockenresistenz in der Richtung von oben nach unten. Das zweite und dritte erwachsene Blättchen war schon etwas schlechter erhalten als das beschriebene oberste. Das Fluoreszenzbild war hier am buntesten: $^1/_4$ der Zellen blau und mattrosa (Typ 1 und 2), etwa $^1/_3$ leuchtend gelbgrün und turgeszent (Typ 3), der Rest schwarzbraun (Typ 4) oder tot und leer (Zellsaft ausgeflossen, Typ 6), am Blattsaum zwei Zellreihen kupferrot (Typ 5). Ich verglich hier die Färbung der Zellwände. Sie sind im lebenden Teil schwach orangerosa, im grellgrünen nekrobiotischen ziemlich farblos (Speicherkonkurrenz der Zellsäfte!), bei den schwarzbraunen wieder rötlich und im toten Saum grellrot.

Ich sah Übergänge zwischen den Typen 1, 2 und 3; wahrscheinlich werden manche lebende Zellen durch längere Einwirkung des UV-Lichtes zur grellgrünen Fluoreszenz gebracht. Zwischen Typ 3 und 4 gibt es keine Übergänge.

An den tieferen Blättchen finden sich fast nur mehr nekrotisch-grellgrüne (3) und tote — schwarzbraune (4), grellrote (5) oder leere (6) — Zellen, bei den untersten Blättchen nur mehr tote Zellen der Typen 4—6. In schöner Weise wird der Resistenzgradient durch die differenzierende Färbung der Nekrosestadien mit Akridinorange zur Anschauung gebracht. —

Wir halten vor allem fest, daß die eigentlich nekrobiotischen, noch turgeszierenden Zellen mit Akridinorange bei alkalischer Reaktion zu leuchtend grüngelber oder gelber Zellsaftfluoreszenz angefärbt werden. Es sind die „Vorpostenzellen" zwischen lebenden und toten Blattarealen, die sich auch bei anderen Lebermoosen wiederfinden. Ich spreche von akridinogilbenden Zellsäften und durch sie gekennzeichneten Nekrosen.

III. Versuche an *Allium cepa*.

Die Epidermen der Schuppen unserer Küchenzwiebel liefern ein schier unerschöpfliches Material, das von Küster und, direkt oder indirekt von ihm angeregt, von zahlreichen Zellphysiologen immer wieder mit Erfolg im Dienst verschiedener Fragestellungen verwendet wurde. Beim Arbeiten im UV-Licht wirkt sich der Mangel an Plastiden, deren Eigenfluoreszenz die Beobachtung erschwert, günstig aus. Die Zellen der Außen- und Innenepidermis sind in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften und in ihrem physiologischen Verhalten wesentlich verschieden. Der Zellsaft der äußeren ist reich an lipoiden Substanzen. Jungers (1934) fand an zentrifugierten Zwiebelschnitten, daß in der äußeren Epidermis der Zellsaft, in der inneren das Plasma sich spezifisch schwerer zeigte. — Zu aktiven Verlagerungen nach Plasmolyse — Systrophe, Strang- und Lamellenbildung (Küster 1910, 1918, Germ 1932/33, Höfler 1939 b) — ist das Plasma der Außenhaut in viel höherem Maße befähigt.

Während die Innenepidermis (Oberepidermis), nach vitaler Infiltration (Strugger 1935) als einschichtiges Häutchen abgezogen, ohne sonstige Präparation zu beobachten ist, müssen die Zellen der konvexen Außenepidermis (Unterepidermis) an Flächenschnitten untersucht werden. Dabei sind die äußeren Zellreihen der Wirkung des Traumas ausgesetzt. Zahlreiche Forscher haben diese vor Augen gehabt, aber erst Küster (zumal 1926, 1929) hat die nekrobiotischen Vorgänge an den verwundeten und wundnahen Zellen am Schnittrand cytomorphologisch studiert. Er spricht von Plasmoschise, wenn ansehnliche dicke Plasmaschichten sich an der Zellhaut erhalten, während andere Teile des Protoplasten sich unter osmotischer Wasserabgabe kontrahieren. Wenn auf geschädigte Zellen ein Plasmolytikum einwirkt, tritt solche Plasmoschise in zahlreichen Formen auf. Zur normalen Plasmolyse vermitteln vielfache Übergänge: das Plasma hebt sich oft nur ein wenig von der Wand ab, die Vakuole kontrahiert sich aber stark (Küster 1926, S. 92, Abb. 10).

Ich beschrieb anläßlich meiner Studien über Kappenplasmolyse (1934, 1939) die Zonenbildung an mit K-Salzen plasmolysierten Zwiebelschnitten. Zu äußerst entstand eine Randzone mit pathologischen Plasmolyseformen, die die erwähnten Küsterschen Wundnekrosen umfaßt, dann in der lebenden und dauernd lebensfähigen Zellfläche eine Außenzone mit Kappenplasmolysen, an denen die Intrabilität für das Salz erhöht, die Permeabilität erniedrigt ist, und eine Innenzone mit normalen Plasmolysen.

S c h i n d l e r (1938 b) beschrieb analoge Zonenbildungen, die unter der Wirkung von Chromsäure an Zwiebelschnitten entstehen. K a m i y a (1939, S. 377) beobachtete, daß bei der Nekrose von Zwiebelschnitten in reinem Wasser die randnahen Partien als mehrere Zellagen breiter Ring wesentlich länger am Leben bleiben

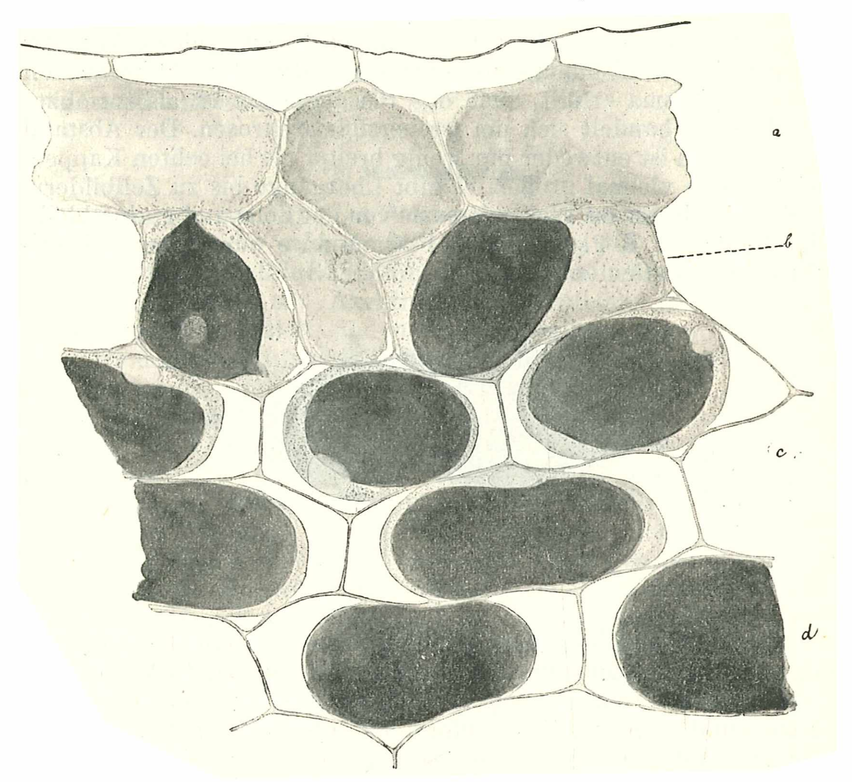


Abb. 2. *Allium cepa,* Außenepidermis, Schnittrand. Präp. 15—30 Minuten in 0,6 n KCl plasmolysiert: *a* tote Randzellen, *b* Tonoplastenplasmolysen, *c* D o p p e l s a u m p r o t o p l a s t e n, *d* normale Plasmolysen (die sich später zu Kappenplasmolyse entwickeln können).

können als die der Wundwirkung ferneren Zellen des Mittelfeldes, und S ch i n d l e r hat in einer umfassenden, noch unveröffentlichten Studie eine auffällig erhöhte Resistenz solcher Randzonen gegen Kupferwasser nachgewiesen.

Nicht jedes Zwiebelmaterial liefert in Alkalisalzen Kappenplasmolysen. Aber überall finden sich an entsprechend dünn aus-

keilenden Flächenschnitten der Konvexepidermis Randnekrosen, die einer Kappenplasmolyse äußerlich ähnlich sehen. Sie haben mit dieser die doppelte Konturierung und das deutliche Hervortreten der Vakuolenhülle gemeinsam. Aber die Außenkontur erscheint vielfach nicht wie bei vitaler Kappenplasmolyse als sphärische Hülle, sie ist, um mit Küster (1941, S. 141) zu sprechen, nicht „turgorgeschwellt", sondern unregelmäßig konvex oder eckig. Der Raum zwischen Tonoplast und Plasmalemma ist nicht mehr von lebendem Plasma erfüllt, auch das Plasmalemma ist als tot anzusprechen. Es handelt sich um irreversible Nekrosen. Der Abstand der Konturen ist entweder nur wenig breiter als bei echten Kappen, meist jedoch vielmal größer; es gibt Übergänge bis zu Zellbildern, wo die Abhebung des Plasmalemmas von der Zellwand gering bleibt oder fehlt, der Küsterschen Plasmoschise oder ihren nekrotischen Folgestadien entsprechend (Abb. 2, 3).

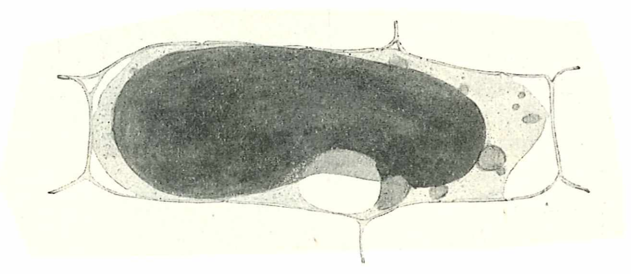


Abb. 3.

Ich habe nun beim zellphysiologischen Unterricht oft die Erfahrung machen müssen, daß Anfänger diese Randnekrosen mit Kappenplasmolysen verwechseln[3]. Ich halte es für an der Zeit, diese häufige und typische Nekroseform mit einem eigenen Namen zu belegen, und will sie im Gegensatz zur Kappenplasmolyse als „Doppelsaumplasmolyse" bezeichnen. Nur dort wird von solcher zu sprechen sein, wo beide Plasmagrenzschichten sichtbar sind, wo aber das Plasmalemma tot und das Plasma nicht mehr „turgorgeschwellt" ist. Bei echter Kappenplasmolyse, mag sie reversibel oder irreversibel sein, ist der von den Plasmagrenzschichten umschlossene Raum noch von gequollenem „turgeszierendem" Cytoplasma erfüllt. Die Doppelsaumprotoplaste sind meist oder immer unter Beteiligung einer Plasmoschise entstanden.

[3] Im Institutsjargon hatte sich für solche Protoplastenbilder ein Ausdruck eingebürgert, man nannte sie „falsche Kappenplasmolyse" oder „falsche Kappen".

Mit diesem Namen aber, der primär einen Vorgang bezeichnet, auch das fertige Bild zu belegen, geht nicht an, weil allzu vielerlei cytomorphologisch verschiedene Gebilde durch Plasmoschise entstehen können. Nicht immer sind Randzone und Kappenzone bei einfacher Hellfeldbeobachtung in ihrer Abgrenzung klar zu erkennen; dann läßt sich die Fluorochromfärbung zur Klärung heranziehen[4]. Bevor ich aber darauf eingehe, ist über meine fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen an Zwiebelinnenepidermen zu berichten.

a) Innenepidermis.

Meine oft wiederholten Versuchsreihen bestätigten, was die experimentelle Seite anlangt, Struggers (1940) Befunde bis ins einzelne. Die prächtigen Bilder metachromatischer Fluoreszenzfärbung, die man mit Akridinorange 1 10.000 in abgestuften Phosphatpuffern erzielt, sind vorzüglich geeignet, die c_H-Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme und Stoffverteilung in der lebenden Zelle zu veranschaulichen.

Siehe Tabelle auf S. 600.

Die Vakuolen der Innenepidermis färben sich im alkalischen Farbbad und schon vom Neutralbereich aufwärts kupferrot an, von p_H 6,5 abwärts bleiben sie völlig ungefärbt. Der stumpf kupferroten Färbung im UV-Licht entspricht eine gelbe Vitalfärbung im Tageslicht. In den färbenden Lösungen permeieren die undissoziierten Moleküle durchs Plasma in die Vakuolen. In den sauren Zellsaft gelangt, erleiden sie eine Dissoziation, während neue Farbmoleküle endosmieren. Die Ionen reichern sich so stark an, daß der Zellsaft in der stumpf kupferroten Farbe der gelösten (wahrscheinlich polymerisierten) Kationen fluoresziert.

Wie bei Strugger war auch bei mir die Rotfärbung stets mit einer Vakuolenkontraktion schwächeren oder stärkeren Grades verknüpft (Abb. 4). Die freigelegten Zellecken sind von Cytoplasma erfüllt, das im Hellfeld strömt oder ruht, im UV-Licht farblos bleibt oder schwach oder deutlich blaugrün fluoresziert. — Meine Protokolle enthalten darüber zahlreiche Aufzeichnungen. Ich teile einige davon mit.

[4] Es wäre nahe gelegen, an den Zwiebelzellen vor allem die von Biebl (1942 a, b) studierten, durch UV-Bestrahlung hervorgerufenen Nekrosen färberisch zu untersuchen. Für diese Aufgabe kommt jedoch nach Struggers (1941) Erfahrungen vor allem die Fluorochromierung mit Pyronin in Betracht. Die vorliegende Untersuchung soll sich aber auf die Anwendung des einen Fluoreszenzfarbstoffes Akridinorange beschränken.

Allium cepa, Innenepidermis, fluorochromiert mit Akridinorange (aus Strugger, 1940a, S. 102)

p_H ungef./gef.	Membran	Plasma	Kern	Vakuole	Bemerkungen
2.07 / 2,04	+ grüngelb	–	–	–	Membranen grüngelb! Zellen am Leben, normal
3.44 / 3,45	+ + + kupferrot	–	–	–	Membranen kupferrot! Zellen am Leben, normal
4,98 / 4,76	+ + + kupferrot	–	+ – grün	–	keine Vakuolenkontraktion
5,98 / 5,98	+ + + kupferrot	+ – grün	+ grün	–	keine Vakuolenkontraktion
6,48 / 6,42	+ + + kupferrot	+ grün	+ + grün	–	keine Vakuolenkontraktion
7,16 / 7,18	+ grüngelb	+ + grün	+ + grüngelb	+ + + kupferrot	Vakuolenkontraktion. Besonders in Wundrandzellen stärkere Vakuolenfärbung
7,36 / 7,39	+ grüngelb	+ + grün	+ + grüngelb	+ + + kupferrot	Vakuolenkontraktion. Besonders in Wundrandzellen stärkere Vakuolenfärbung

18. März, $p_H = 8{,}0$. Nahe am Schnittrand starke Vak.-Ko. (Vakuolenkontraktion), die fast wie schwache Plasmolyse aussieht; die plasmaerfüllten Zellzwickel matt blaugrün fluoreszierend. Im Weißlicht sind diese Zwickel von körnigem, leicht getrübtem Plasma erfüllt. Innen Vak.-Ko. schwächer, Plasmazwickel im UV-Licht fast leer, im Weißlicht von klarem Plasma mit lebhafter BMB erfüllt.

$p_H = 8{,}8$. Ähnlich, Vak.-Ko., Plasmazwickel durchwegs zartgrün. Tote, durch den Schnitt eröffnete Saumzellen mit grünen Zellkernen und zart gelbrotem, koaguliertem Plasma. In einer Randzelle, die nur an der äußersten Spitze aufgeschnitten ist, ist das Plasma nahe der Wunde gelbrot, das zusammengedrängte Plasma am inneren, wundfernen Zellende aber grün bis

gelbgrün. Der Farbton ist anders als der des zart blaugrünen Plasmas in den Endzwickeln der Zellen im Schnittinneren.

$p_H = 10,1$. Vak.-Ko. Vakuoleninhalte intensiv stumpf kupferrot. Das Plasma in den Zwickeln zeigt hier bei starker Vergrößerung im Weißlicht noch BMB, es ist im UV ganz zart blaugrün. — Ich suchte im UV stärker blaugrüne Zwickel auf und schaltete jeweils auf Weißlicht um; jene Zwickel zeigen keine BMB der Mikrosomen mehr oder nur noch schwächste solche; das Plasma muß als getötet gelten.

$p_H = 7,4$. Vak.-Ko. schwach. Im Weißlicht innen schwache, in der Randzone stärker gelbe Vitalfärbung des Zellsaftes. Im UV Farbe stumpfrot in entsprechend abgestufter Intensität. — Innen im Schnitt sind auch bei schwacher Vak.-Ko. die kleinen Plasmazwickel zum Teil recht deutlich blaugrün. Im Weißlicht zeigen sie BMB und sogar leichte Plasmaströmung. — Die rechteckigen Präparate waren in dieser Reihe durch einen schrägen Diagonalschnitt in zwei dreieckige Schwesterschnitte geteilt worden; der eine wurde untersucht, der andere nachher unbestrahlt in NH_3 gebracht (vgl. S. 623 f.) Ich durchmusterte die toten Zellen am schrägen Schnittrand. In den durch den Schnitt geöffneten war das Plasma rot gefärbt, in den geschlossen gebliebenen war das wie geronnen aussehende Plasma in den wundfernen Zellenden grün gefärbt. Der Zellsaft war ausgeflossen.

$p_H = 6,35$. Vakuolen im UV optisch leer und nicht kontrahiert. Zellwände kupferrot. Zellkerne zartgrün. Im Hellfeld sieht man, daß von letzteren Plasmastränge ausstrahlen, die lebhafte Zirkulationsströmung aufweisen. Im UV ist dieses Plasma, bei starker Vergrößerung eingestellt, optisch leer.

22. März, $p_H = 8,75$. In Zellen mit Vak.-Ko. ist das Plasma manchmal im Hellfeld geschichtet. Innere Schicht körnig getrübt, die äußere hat noch BMB. Im UV ist nur die innere blaugrün, die äußere ist dunkel. Auch sonst Plasmaecken mit flüssigem Plasma im UV leer, einzelne wie geronnen aussehende Plasmakappen um rote Vakuolen im UV grün.

Sicherlich kann somit auch lebendes Plasma bei Vak.-Ko. mit Akridinorange grüne Fluoreszenzfärbung annehmen. Das hat Strugger (1940, S. 102) nachgewiesen, und er hat zartgrüne Anfärbung des Plasmas auch schon bei p_H 5,98, wo es noch keine Vak.-Ko. gibt, beobachtet. Anderseits verstärkt sich vielfach die Färbung, die ich als blaugrün bezeichne, bei gleichbleibender Farbqualität mit zunehmendem Grad der Vak.-Ko. im stärker alkalischen Farbbad, und auch noch getrübtes Plasma und irreversibel veränderte Nekrosestadien, die keine BMB mehr zeigen, weisen fast den gleichen Farbton auf.

Wo die Vakuolenkontraktion in der cH-Reihe beginnt, da steigt die Fluoreszenzfärbung des Cytoplasmas sprunghaft an. — Küster (1933) hat im Prune pure einen Farbstoff gefunden, der das Plasma spontan kontrahierter Zellen (der Zwiebelaußenepidermis) analog im Hellfeld lebhaft anfärbt. Er hebt hervor, daß es eine leichte Schädigung oder zumindest eine irgendwie geartete Strukturänderung sein muß, die, mit der Vakuolenkontraktion verbunden, das Cytoplasma zur Speicherung des Prune pure geeignet

macht[5]. Ich glaube, daß Ähnliches für das Akridinorange gelten wird. Diese Annahme gleichartiger Wirkung der beiden Farbstoffe steht allerdings in Widerspruch zu Struggers Auffassung, wonach das Akridinorange an der Eiweißphase des Plasmas adsorptiv festgehalten wird; denn das Prune pure ist, wie Drawert (1938) nachwies, im physiologisch wichtigen Aziditätsbereich nur in Form elektrisch neutraler, lipophiler Moleküle vorhanden und eine adsorptive Anfärbung des Cytoplasmas durch Farbkationen kommt daher bei diesem Farbstoff nicht in Frage.

Das abgetötete Plasma in Schnittrandzellen ist oft koaguliert und ziegelrot bei plötzlicher Tötung, es bleibt dagegen oft grün, wo in den der Wunde abgewandten Polen langgestreckter Zellen die Tötung langsamer erfolgte.

Die Zellkerne der lebenden Zellen erstrahlen im alkalischen Bereich in prächtig vollem grünem Fluoreszenzlicht. Im stärker sauren Farbbad bleiben die lebenden Kerne ungefärbt, während in den meisten toten Zellen auch hier die gleiche intensive Grünfärbung der Kerne eingetreten ist. Im schwach sauren Bereich zeigen die Kerne eine schwache Grünfärbung, und zwar, wie schon Strugger feststellt, auch schon bei p_H-Werten, die den Zellsaft und das Plasma ungefärbt lassen. Ich war zunächst geneigt, in solchen Fällen eine gewisse Intrabilität der Protoplaste für die Farbkationen anzunehmen, wie sie zuerst Strugger (1941, S. 127, 1943) nach analogen Erfahrungen mit anderen Fluorochromen angenommen hat. Wenn man nämlich das Ausbleiben der Vakuolenfärbung mit Akridinorange unter p_H 6,4 bei den Zwiebelhäutchen daraus erklärt, daß der Farbstoff im Farbbad zur Gänze in ionisierter Form vorliege und nicht durchs Plasma bis in den Zellsaft permeieren könne, so ist man in der Tat gezwungen, aus der alleinigen Anfärbung von Kern und Plasma bei schwach saurer Farbreaktion den Schluß zu ziehen, daß hier die Farbionen zwar in das Plasma eintreten, aber nicht durch den Tonoplasten bis in den Zellsaft hindurchtreten können, d. h. daß eine gewisse Intrabilität für die Ionen besteht. Dieser Schlußfolgerung ist aber dann durch meine weiteren Erfahrungen der Boden entzogen worden (vgl. schon Höfler 1947, S. 22, 1948).

Die Kerne in toten Zellen färben sich bis herab auf $p_H = 3$ und weiter ebenso intensiv grün wie im Neutralbereich. Die Tatsache wird bei Strugger nicht erwähnt. Die ausbleibende oder eintretende Grünfärbung der Kerne läßt auf den ersten Blick

[5] Bei Becker (1936, S. 443 f.) die ältere Literatur zur Frage, welche Formen der Diffusfärbung des Cytoplasmas bei reversibler Veränderung, welche nur in degenerierenden Zellen vorkommen.

die ungeschädigten lebenden und die geschädigten Schnittareale unterscheiden. — Rotgefärbt erscheinen gewöhnlich nur relativ wenige Kerne im extremen, durch den Schnitt eröffneten oder dem Wundrand benachbarten Zellen. Diese Kerne sind primär koaguliert und geschrumpft. Sie sind im Hellfeld stark postmortal gelb gefärbt, wogegen die grün fluoreszierenden Kerne im Hellfeld ungeschrumpft und hyalin oder fast so erscheinen und hier farblos sind, auch wenn der Farbstoff in voller Konzentration Zutritt hat. Doch finden sich sehr häufig tote, im Hellfeld leicht angefärbte Kerne, die im UV-Licht gleichwohl in reinem Grün fluoreszieren.

Ein eigenartiges Farbbild boten im Fluoreszenzlicht tote Zellen, eine Reihe vom Schnittquerrand, in p_H 4,9. Sie zeigten grüne Zellkerne mit weißgrauem Nukleolus, aber ziegelrotes, von den Zellwänden weit zurückgezogenes Plasma. Im Hellfeld waren die Kerne oval, glatt konturiert, nicht geschrumpft und leicht postmortal gelblich angefärbt. Das Plasma war völlig koaguliert. Die zweifarbigen Nekrosebilder waren nahezu so schön wie die später zu beschreibenden, die ich durch Färbung nach NH_3-Behandlung erzielte.

Die Zellmembranen verhalten sich ganz wie von Strugger (1940, S. 109) beschrieben. Sie sind unterhalb des IEP, der nach Drawert (1937, 1940) bei oder unter $p_H = 3$ liegt, mattgrün (es handelt sich nach Strugger, S. 113, um bloße Imbibitionsfärbung), von $p_H = 3$ bis $p_H = 6,5$ durch Kationenabsorption „gleißend kupferrot“, von der c_t an, wo die Vakuole zu speichern beginnt, wieder farblos oder bloß grüngelb. Daß hier die Rotfärbung ausbleibt, beruht wohl nicht auf dem Mangel positiv geladener Farbstoffteilchen (denn nur ein Teil des Farbstoffes ist in den ersten p_H-Stufen undissoziiert), sondern auf der Konkurrenz des speichernden Zellsaftes. Dafür spricht, daß sich die Membranen in toten Zellpartien vielfach auch bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion intensiv rot färben. Gleiches tritt bei den später zu erwähnenden Parenchymversuchen noch deutlicher hervor. Vgl. auch Struggers (1940 c) Beobachtungen für Neutralrot.

In stärker saurer Reaktion, d. h. im isoelektrischen Bereich, fiel mir oft eine weißgelbe Membranfluoreszenz auf, die sich zwischen die Bereiche der Rotfärbung durch Elektroadsorption und der grünen Imbibitionsfärbung unter dem IEP einschiebt. Noch bei $p_H = 2,8$ sah ich partienweise rot und gelbweiß gesprenkelte Membranen, Vgl. auch Höfler u. Pecksieder 1947, S. 107.

Nahe am Schnittrand ist die Membranfärbung oft sehr viel greller als im Inneren der Präparate. Im alkalischen Bereich ist die grellrote Färbung auf die an die Schnittränder grenzenden Zellwandteile beschränkt. Sie

reicht oft etwa $^1/_4$ bis $^1/_2$ Zellänge von den Querwänden nach innen und klingt in den Membranen spitzkeilartig nach innen aus (solche „Feuerkeile“ am Schnittrand notierte ich regelmäßig im alkalischen und neutralen Bereich). Dieses „Schnittrandphänomen“ tritt bei alkalischer Reaktion des Farbbades am deutlichsten in Erscheinung. Um p_H 6 ist die grellrote Membran der Schnittränder von den leuchtend kupferroten Membranen der Innenfläche nicht deutlich abgesetzt (vgl. Tabelle S. 615). Bei p_H 5 erscheint der Schnittquerrand nur als ganz zarte, einfach rote Linie und bei p_H etwa 3,4 fand ich, entgegengesetzt wie früher, die Membranen im Inneren noch mattrot, an den Schnitträndern aber völlig farblos bzw. grünlich; in bestimmten Präparaten verfloß die Farbe $^1/_2$ bis 1 Zellänge vom Rand allmählich oder es waren kurze weißgelb fluoreszierende Membranstücke zumal in den gegen den Schnittrand gerichteten Zellspitzen der ersten und der zweiten Zellreihe eingeschaltet. Bei der mattgrünen Imbibitionsfärbung in p_H 2 bleiben die Schnittränder farblos und zeigen keinerlei Differenzierung.

Bestimmung des Umschlagpunktes Membran-/Vakuolenfärbung.

Im Reihenversuch mit Akridinorange fällt am meisten der plötzliche Umschlag von der Membran- zur Zellsaftfärbung auf, der bei p_H-Stufen von 0,5 bis 0,7 stets vollständig von einer Stufe zur benachbarten sich vollzieht. Ich konnte Struggers Beobachtungen (1940, S. 102) ausnahmslos bestätigen. Um p_H 6,3 zeigten meist alle Zellen der Innenepidermis leuchtend kupferrote Membranen und völlig leere dunkle Vakuolen, bei p_H 7,1 aber vitale stumpf kupferrote Vakuolenfärbung, die, soweit meine Erfahrung reicht, immer mit einer leichten Vakuolenkontraktion gleichmäßigen Grades verbunden ist. Der Umschlag ist schärfer, als er im bekannten Neutralrotversuch und anderwärts mit Hellfeldfarbstoffen (Strugger 1936, Drawert 1940) beobachtet wird.

Ich trachtete, den Schwellenwert genau zu bestimmen. Im Hauptversuch vom 7. Juli wurden 3—4 Stunden zuvor bereitete Puffergemische aus primärem und sekundärem Phosphat verwendet. Die Lösungen wurden geteilt. Zur gleichen Stunde ermittelte Dr. Mikschik mit dem Ultraionographen und mit Corningglaselektroden die p_H-Werte der gepufferten Akridinorange- und ungefärbten Phosphatlösungen, während ich, mit Assistenz von Frau Dr. Pecksieder, die Färbeversuche durchführte. Die verwendete Zwiebel war trocken ein wenig ausgetrieben, die Gewebe aber fest und gesund.

Allium, Innenepidermis

p_H ungefärbt / gefärbt	Vakuole	Kern	Plasma	Membran
6.20 / 6,28	leer	grün	—	gleißend kupferrot
6,45 / 6,48	leer, 1/2 d. Fl. kontrahiert	+ grün	—, 1/2 d. Fl. blaugrün	zart kupferrot
6.60 / 6,68	stumpf kupferrot, kontrahiert	+ + grün	blaugrün	perlschnurartig lackrot
6.75 / 6,85	zart kupferrot, kontrahiert	+ + grün	blaugrün	perlschnurartig lackrot bis zart kupferrot
6,95 / 6,96	kupferrot, kontrahiert	+ + grün	blaugrün	zart lackrot bis farblos

Bei p_H 5,92 und 6,28/6,20 waren die Vakuolen leer und unkontrahiert, die Membranen wie immer gleißend kupferrot. Bei 6,2 zeigten nur einige Zellgruppen eine zarter rote Membranfärbung. Bei 6,48/6,45 war der Zellsaft noch völlig leer, doch war in etwa der halben Fläche des Präparats schon eine deutliche Kontraktion der Vakuolen eingetreten, wobei die zarten Tonoplasten in der bekannten Weise als Kugelmenisken sichtbar wurden. Bei 6,68/6,60 war die stumpf kupferrote Zellsaftfärbung schon allgemein und alle Vakuolen waren kontrahiert; die Membranen waren noch lackrot bis zart kupferrot und erschienen stellenweise durch den ungleichen Farbton perlenschnurartig ge-

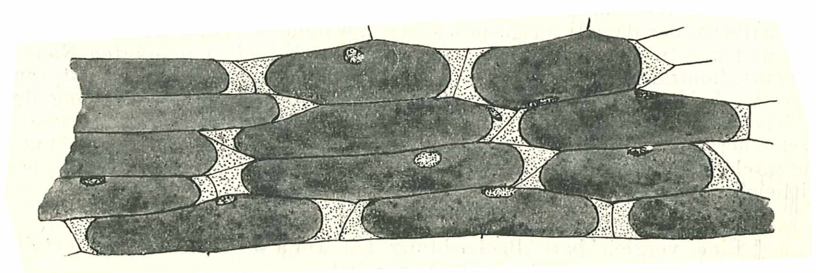


Abb. 4. Innenepidermis von *Allium cepa,* in Akridinorange (p_H 7,5) gefärbt. Vakuolenkontraktion (dunkel: rot, punktiert: grün).

gliedert. Bei p_H 6,85/6,75 waren die Vakuolen rot, in der Farbintensität von zartem bis zu fast dunklem Kupferrot abgestuft und die Membranen perlenschnurartig wie früher. Bei p_H 6,96/6,95 sind die Vakuolen gleichmäßig kupferrot, die Membranen bloß zart lackrot bis farblos. Im alkalischen Bereich blieb das Bild das gleiche wie gewöhnlich. Abb. 4 zeigt den Grad der Vakuolenkontraktion in p_H 7,44/7,50. Er ist im Sommer stärker, aber nicht minder gleichmäßig als am winterlich ruhenden Material.

Die Grenzbestimmung lehrt, daß die vitale Zellsaftfärbung bei p_H 6,60 unvermittelt auftritt, daß aber schon eine Stufe früher, bei p_H 6,48/6,45, wo die Zellsäfte — zumindest bei der von mir verwendeten Optik — im UV-Licht noch völlig dunkel bleiben, Vakuolenkontraktion trotzdem schon eingetreten ist[6]. Die letztere beginnt hier also in der Feinreihe um eine Stufe früher als die rote Vakuolenfärbung. Wo Kontraktion zustandegekommen ist, sieht man das in den Zellenden gesammelte Plasma aber sicher im zartblaugrünen Fluoreszenzlicht.

Als Küster (1926) an Zellen der Konvexepidermis von *Allium* das Phänomen der Vakuolenkontraktion beschrieb, fand er, daß Wundreiz und Neutralrotzufuhr Voraussetzungen für ihr Sichtbarwerden sind. Weber (1930) und Kunze (1931) zeigten dann an neutralrot gefärbter *Elodea,* daß die Spontankontraktion erst oberhalb einer gewissen p_H-Grenze — in jenem Fall über 7,2 — zustandekommt. Henner (1934, S. 104) unterschied zwei Haupttypen der Kontraktion: die „schwache Kontraktion", die in allen Zellen eines Gewebes gleichmäßig auftritt, meist bis zu einer Verkleinerung von ¼, höchstens ½ führt, wobei die Zellen lange am Leben bleiben, und die „starke Kontraktion", die in vereinzelten Zellen meist nahe dem Wundrand auftritt, stärkere Grade erreicht und nachher meist irreversibel zum Zellentod führt. Bei der „starken" sinkt nach Hartmair (1938) vielfach der osmotische Zellsaftwert, bei der „schwachen" bleibt er etwa gleich. Der Mechanismus beider Erscheinungen ist wohl wesentlich verschieden. Die von Küster (1926) beschriebenen Kontraktionen gehören dem Typ der „starken" Kontraktion, die von Weber (1930) beschriebenen dem Typ der „schwachen" an. Zahlreiche weitere Fälle (vgl. Küster 1938, 1942 u. a.) sind später untersucht worden. — Ich habe alle Versuche Henners gesehen und halte an der damals ausgesprochenen Zweiteilung fest. Doch erscheint es mir weder notwendig noch berechtigt, den von Küster geprägten Namen „Spontankontraktion der Vakuolen", der allgemein eingebürgert ist, auf eine der beiden Typen zu beschränken und etwa die bei Vitalfärbung der Zwiebelinnenepidermen oberhalb gewisser p_H-Grenzen auftretenden Vakuolenverkleinerungen schwachen oder schwächsten Grades von der Bezeichnung auszuschließen. Doch wären spezifische Termini für die zwei Haupttypen vielleicht erwünscht[7].

[6] Eine vergleichbare Beobachtung hat Drawert (1941) mitgeteilt; vgl. auch Strugger (1940 c) für Neutralrot.

[7] Ich spreche seit 1946 von „Allgemeinkontraktion" und „Einzelkontraktion".

Buntfärbung mit Akridinorange.

Während die meisten Reihenversuche in der geschilderten Weise verliefen, die Zellsäfte also — wie in Struggers Versuchen — einheitlich im schwach sauren Bereich optisch leer, im basischen stumpf kupferrot erschienen, beobachtete ich in einigen Fällen eine wesentlich andere Reaktion der Innenepidermen auf die Behandlung mit Akridinorange, nämlich bunte, vielfarbige Fluoreszenzfärbung der Vakuolen. Die Zellsäfte färben sich — in ziemlich weitem p_H-Bereich — felderweise rot, felderweise gelb und grün, wobei die einzelnen Areale vielfach 1—10 Zellreihen breit und einige Zellen lang waren. Benachbarte Zellen färben sich aber oft ganz gleich und man könnte mit statistischen Methoden die Bevorzugung solcher gleichsinniger Reaktionen ebenso zahlenmäßig erfassen, wie Pekarek und Fürth (1931) für die Richtung der Plasmarotation in *Elodea-densa*-Zellen es getan haben.

Mit einem solchen Material habe ich am 22. März den folgenden Reihenversuch aufgenommen:

$p_H = 6{,}6$. Schnitte 15 Minuten angefärbt, dann im betr. Puffer kurz ausgewaschen. Präparat bunt, Zellen felderweise rot, felderweise gelb und grün. Manche Zellen orange, orangerot und orangegelb; solche dem Anschein nach mischfarbige Zellen liegen mehr einzeln an der Grenze der Zellfelder. Im Hellfeld sieht man keine Farbunterschiede.

Die im UV roten Zellen haben alle schwache Vak.-Ko. (Vakuolenkontraktion) in den Ecken; das Plasma zeigt hier im Hellfeld normale BMB. Die grasgrünen Zellen haben nirgends Kontraktion! Die gelben Zellen auch nicht! Einzelne orangefarbige Zellen haben schwache Vak.-Ko. in den Ecken. — Ich durchmusterte das ganze Präparat: alle roten Zellen haben Vak.-Ko., alle orange haben schwache solche, die grünen und die gelben sind unkontrahiert. Die Grenze der Felder ist bezeichnet durch einzelne gelbe Zellen mit orangegelbem Einschlag, die schwach kontrahiert sind.

Es ergibt sich folgende Skala der Farbtönungen der Zellsäfte:

1. dunkelkupferrot, mit Vakuolenkontraktion,
2. orangerot, mit Vakuolenkontraktion,
3. rein orange, mit Vakuolenkontraktion,
4. orangegelb, mit oder ohne Vakuolenkontraktion,
5. gelb, ohne Vakuolenkontraktion,
6. grüngelb und grün, ohne Vakuolenkontraktion.

Was die Zellkerne betrifft, so sind sie in den roten Zellen zart blaugrün, manchmal vollgrün, in den orange Zellen ganz zart blaugrünlich, häufig fast dunkel und in den gelben und grünen ungefärbt. Die Kerne scheinen sich hier also nur in den Zellen mit Vak.-Ko. grün anzufärben (in toten leeren Zellen sind die Kerne wie sonst aufgequollen und grasgrün, ihre Nukleolen farblos). Die Zellwände sind im allgemeinen ungefärbt, in roten und orange Zellfeldern zum Teil schwach weißgelb, in gelben Feldern dunkel. Die Randfetzen der Zellwände sind feuerrot wie immer.

p_H = 8,0. Auch hier ist die Innenepidermis bunt. Zellsäfte rot, mattgelb, grün und grau. Im Hellfeld zeigen die Zellen Vak.-Ko. oder beginnende Vak.-Ko. mit Plasmaströmung in den Zellecken oder keine Vak.-Ko., sondern normale Zirkulationsströmung. Solche strömende Zellen haben im UV grüngelben Zellsaft. Zellen mit beginnender Kontraktion, Plasmabewegung in den Ecken und zarten noch nicht kugelkonvexen Tonoplasten sind im UV charakteristisch grünlichgelb. Zellen mit Vak.-Ko. und BMB. in den Plasmazwickeln sind gelb, grauorange oder rot. Je stärker die Färbung, desto weiter vorgeschritten ist die Vak.-Ko. Der Grad der Färbung bestimmt den Grad der Kontraktion. Die Plasmaströmung hört nicht sogleich auf, wenn die Kontraktion eintritt.

Das Präparat wurde nach 2½stündigem Aufenthalt im ungefärbten Puffer, wo sich nichts Wesentliches geändert hatte, in 0,8 mol Traubenzucker plasmolysiert. Es ergab sich ein prächtiges Bild. Normale Plasmolyse erfolgte sowohl in den roten, als in den orange und den gelben und grüngelben Zellen. Im Hellfeld sind alle Protoplaste vital gelb gefärbt, und zwar etwa gleich stark. Ich betrachtete im Hellfeld die Plasmolyseformen. Sie waren entweder kugelkonvex (Endplasmolyse) oder schrägkonturiert bis schiefkonvex, mit Plasmazapfen und manchmal mit Kernwarzen außen an der Rundung (noch keine Endform). Im UV ergab sich einheitlich, daß die konvexen Protoplasten tiefrote, die imperfekten gelbe oder grüngelbe Zellsäfte hatten; die orangefarbigen zeigten, auf Weißlicht umgestellt, annähernd konvexe Plasmolyseformen. Mit steigender Kationenspeicherung und Vakuolenkontraktion wird also, nach Webers (1921) bekanntem Prinzip beurteilt, die Viskosität des Cytoplasmas stufenweise herabgesetzt.

Die Zellkerne sind leuchtend grün in roten, grün in orangeroten, farblos in hellgelben Protoplasten. Die Cytoplasmen sind meist optisch leer (nur in einzelnen getöteten oder nekrotischen Zellen grün).

p_H = 8,9. Ähnlich, doch im UV Vakuolen großenteils rot, kontrahiert; wenige Zellen orangegelb, nur in zwei Zellen grasgrün, im Hellfeld ohne Strömung. Einzelne rote Zellen mit toten grünen Plasmakappen außen an den Tonoplasten, sonst Plasmaecken leer.

p_H = 10,1. Vakuolen überall gleichmäßig dunkelkupferrot, Kerne grell grasgrün, in der Aufsicht gelblichgrün, Plasma in den Zellecken tot, ohne BMB, im UV blaugrün. Membranen farblos, wo Vakuolen gefärbt, in toten Schnitteilen aber feuerrot.

Von Interesse ist im Reihenversuch das Verhalten der Präparate in saurer Lösung:

p_H = 4,9. Vakuolen großenteils dunkel wie gewöhnlich, Zellmembranen rot. Eine große Insel, 7 Zellreihen breit und ungefähr 20 Zellen hoch, hat aber im UV grasgrüne Zellsäfte und zartrote Membranen. — Im Hellfeld sieht man, daß auch in diesen Zellen die Kerne leben und daß in den von ihnen ausgehenden Plasmabändern und -segeln eine deutlich intensivierte Strömung herrscht. In den im UV dunklen Zellen daneben ist die Strömung in den Plasmasträngen schwächer. Im UV erscheinen die beiden Zellareale scharf abgegrenzt, nur einzelne Zellen mit zartgrün angefärbten Vakuolen schieben sich an den Grenzen ein. Im Hellfeld sieht man keinen Unterschied abgesehen von der intensiveren Strömung (ob diese etwa erst durch die UV-Bestrahlung ausgelöst wurde, bleibt fraglich).

Der Schnitt kam in 0,8 mol Traubenzucker (in dest. H_2O). Hier plasmolysieren die beiderlei Zellen gleich gut. Konturen flach konvex. Die Zonen erhalten sich unvermindert. Die farblosen Protoplaste heben sich doch mit

ganz zart dunkelblaugrünem Vakuoleninhalt vom schwarzen Hintergrund ab. Von Kernen sieht man keine Spur. Die grünen Protoplasten sind jetzt, der Einengung des Zellsafts entsprechend, lebhaft grasgrün; die Kerne auch in ihnen dunkel. Im Hellfeld beginnt bereits Systrophe. Die Zellwände im Hellfeld gelb, im UV-Licht in beiden Arealen rot. — Gelbe und rötliche Vakuolenfarbtöne fehlen in der sauren Lösung gänzlich.

Während die rote und orange Fluoreszenzfärbung der Zellsäfte stets zu Vakuolenkontraktion führt, bleiben die gelben und grüngefärbten Zellen ohne solche. Wenn die direkte Beobachtung Zweifel darüber zuläßt, ob schwache Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit einer Aufquellung des Plasmas verbunden ist oder eine bloße Zusammendrängung in den Ecken durch die gespannten Tonoplasten, wie sie von anderen Beispielen der normalen und pathologischen Cytogenese her wohlbekannt ist, bedeutet (vgl. Küster 1942, S. 251, Biebl 1942 a, S. 500), so läßt die raschere Rundung, die kürzere Plasmolysezeit der rot und orange fluoreszierenden Zellen im vorliegenden Fall eine Verminderung der Viskosität des Plasmas dieser Zellen sicher erkennen und eine damit verbundene Quellungs- und Volumzunahme des Plasmas auch ohne Volummessung erschließen.

Nur die Vitalfärbung mit Akridinorange, die mit einer Speicherung der roten Kationen im Zellsaft verbunden ist, führt also zur Plasmaaufquellung und Vakuolenkontraktion, die Anreicherung des grün und gelb fluoreszierenden Farbstoffes in den Vakuolen aber nicht.

Zur Frage der p_H-Abhängigkeit der Buntfärbung habe ich im Juli noch folgendes beobachten können. Im vollständigen, von p_H 2 bis p_H 10,4 aufgenommenen Reihenversuch, dem die Grenzbestimmung (S. 605) entnommen ist, fand sich die Buntfärbung in einem kleinen Areal eines Teiles der Präparate; der Neutralbereich von p_H 6,35—8,0 war dabei bevorzugt. Bei p_H 6,7/6,6 gab es inselweise orange, grauorange, graugelbe, gelbe, gelbgrüne Zellen, während zwei Drittel der Zellfläche gleichmäßig kupferrot gefärbt waren und diese Färbereaktion als die „normale" erkennen ließen. Bei p_H 6,8 ist ein grasgrüner Zellstreifen durch 2—3 Reihen graugelber Zellen vom roten Zellfeld getrennt; andere Inseln und Streifen in der roten Fläche des Präparates sind orange, grauorange, gelb. Dabei sind, wie früher, alle roten und orange Vakuolen kontrahiert, alle gelben und grünen unkontrahiert. Die Zellwände sind im Schnitteil mit roten Vakuolen rot, im grünen und graugelben aber ungefärbt! Dies, wie die im früher mitgeteilten Protokollauszug erwähnte Tatsache, daß die Zellkerne in roten Zellen grün, in gelben aber im UV-Licht leer sind, weist darauf hin, daß die Gelbfärbung der Zellsäfte für Zellmembran und Kern eine stärkere „Konkurrenz" in der Farbspeicherung bedeutet als die Rotfärbung, eine Beobachtung, die überraschend und chemisch zunächst nur schwer auszudeuten ist.

Nach der alkalischen Seite klingt die Buntfärbung im Reihenversuch allmählich aus. Nach Färbung in p_H 8 (und Auswaschung im Puffer um 8,3)

sah ich statt der bunten Felder nur Zellfelder, die gemischt rote und grau-orange, kontrahierte Zellen aufwiesen, dazu nur zwei gelbe, unkontrahierte Zellen und keine mit grünen Vakuolen.

Bei $p_H = 4{,}9$ gab es statt der bunten Zellen nur große Felder von grasgrünen Zellen völlig gleichmäßigen Farbtones. Die Vakuolen sind unkontrahiert (nur eine am Wundrand ist stark verkleinert, dem Typ der „starken Vakuolenkontraktion" entsprechend, ihr Plasmaraum ist optisch leer).

Die feldweise Grünfärbung der Vakuolen bei saurer Farbbadreaktion (p_H um 4,9) ist neu. Sie wurde im März und im Juli beobachtet. Normalerweise bleiben ja die Vakuolen bei dieser cH stets ungefärbt, im UV-Licht leer. Handelt es sich auch um eine Kationenfärbung, die aber hier zum Unterschied vom neutralen Bereich nur bis zur Grünfärbung des Zellsaftes vorschreitet, nicht bis zum Rot der polymerisierten Kationen? Oder liegt eine chemische Verbindung des Farbstoffes mit zelleigenen Stoffen vor? — Die im IV. Abschnitt mitzuteilenden Versuche über die NH_3-Wirkung auf buntgefärbte Zwiebelhäutchen werden zur Entscheidung der Frage führen.

Die Tatsache, daß auch in sauren Lösungen Akridinorange-Farbstoff bis in den Zellsaft dringt, ist überraschend und mit Struggers Ansicht, daß die Farbpermeation nur oberhalb der p_H-Grenze 6,5 stattfindet, nicht vereinbar.

Die Literaturdurchsicht ergab, daß schon Drawert (1938, vgl. 1937 b, S. 382) an Innenepidermen der Zwiebelschuppen von Allium cepa ein der Buntfärbung in Akridinorange analoges Phänomen beschrieben hat; er beobachtete es nach Färbung mit schwach alkalischer Neutrallösung (p_H 8,3). Während die Häutchen aus ruhenden Zwiebeln eine gelbrote Vakuolenfärbung annahmen, ändert sich nach vorangegangener Verletzung der Farbton immer mehr nach rot und schließlich nach violettrot. Oft liegen die verschieden getönten Zellen im Mosaik. Drawert hat festgestellt, daß die mit Neutralrot gelbrot gefärbten Zellen allgemein eine spontane Vakuolenkontraktion aufweisen, die Zellen mit violettrotem Zellsaft aber niemals, selbst wenn man sie durch mehrere Stunden im Farbbad beläßt. — Es ist höchst wahrscheinlich, daß meine gelbe und grüne Fluoreszenzfärbung nach Akridinorangebehandlung der violettroten Hellfeldfärbung mit Neutralrot entspricht und die Rotfluoreszenz mit Akridinorange der gelbroten Neutralrotfärbung. Nur die letzteren Färbungen sind mit Plasmaaufquellung und Vakuolenkontraktion verbunden. — Drawert u. Strugger (1938, S. 47) erwähnen eine vergleichbare Mosaikfärbung mit Methylenblau.

Die genannten Autoren haben wiederholt beschrieben, daß sich an austreibenden Zwiebeln die Fähigkeit der Innenepidermiszellen, Farbstoffe zu speichern, wesentlich ändert. So werden von diesen Zellen bei ruhenden Zwiebeln Prune pure und Rhodamin B, zwei im Neutralbereich nicht dissoziierte Farbstoffe, nur im Zytoplasma gespeichert, dagegen wenn die Zwiebeln austreiben, auch in der Vakuole. Jetzt verhält sich also die Innenepidermis in ihrem Speicherungsvermögen ähnlich wie die Außenepidermis, deren Zellsäfte ja immer Farbe speichern. — Daß aber doch ein faßbarer Unterschied in der Art der Speicherung besteht, hat Drawert (1939, S. 384)

gefunden und durch gute Photos belegt. Ich halte seine Beobachtung für wichtig. Nach Färbung mit Rhodamin B trat in der Vakuole der Außenepidermis „sofort eine Entmischung von kleinen Tröpfchen auf, die bald zu großen Tropfen zusammenflossen". Wenn in der Innenepidermis die Vakuolen auch speicherten, dann war auch hier „eine Bildung von kleinen Tröpfchen zu beobachten, die aber nicht wie bei der Unterepidermis sich zu großen Tropfen vereinigten, sondern sich nur zu größeren Aggregaten aneinanderlegten". Es sind also wahrscheinlich nicht die gleichen zelleigenen Stoffe, an die der Farbstoff in der Außen- und in der Innenepidermis gebunden wird. Vgl. ferner Drawert, 1941, S. 54.

b) Außenepidermis.

Außen- und Innenepidermis der Zwiebelschuppen verhalten sich bekanntlich im Vitalfärbungsversuch wesentlich verschieden. Mit Prune pure wird in der Innenepidermis nur das Cytoplasma und der Zellkern mit violettem Ton angefärbt, in der Außenepidermis dagegen nur die Vakuole mit blauem Farbton (Ruhland 1912, S. 381, Schaede 1923, Küster 1933, Schönleber 1936, Drawert 1939). Chrysoidin (Wulff 1934), Bismarckbraun und andere basische Farbstoffe verhalten sich ähnlich. In der Außenepidermis färbt sich also der Zellsaft vielfach an, in der Innenepidermis bleibt er ungefärbt. Dort sind farbstoffspeichernde Substanzen lipoider Natur in der Vakuole gelöst, die in der Innenepidermis fehlen. Drawert (1940/41), der sich mit der Frage der Stoffspeicherung eingehend beschäftigte, hat 40 basische Hellfeldfarbstoffe in p_H-gestuften Reihenversuchen durchgeprüft und bei vielen Zellsaftfärbung nur in der Zwiebel-Außenepidermis oder ungleiche Färbungsschwellen der Außen- und Innenepidermis in der p_H-Reihe nachgewiesen. Er vermutet in den speichernden Lipoiden freie Fettsäuren. Endgültiges ist über ihre chemische Natur leider noch nicht bekannt. Wir wissen auch noch nicht, ob es sich bei den metallbindenden Vakuolenstoffen der Zwiebelaußenhaut (Gicklhorn 1931, Schindler) um dieselben Substanzen wie bei der Farbstoffbindung handelt oder nicht.

Während Strugger das Verhalten der Innenepidermis gegen Akridinorange schon eingehend studiert hat, fand ich für die Außenepidermis und das angrenzende Parenchym im Schrifttum noch keine Angaben.

Die zu färbenden Flächenschnitte wurden von der konvexen Seite anthokyanfreier Zwiebelschuppen so angefertigt, daß sie teils einzellschichtig, teils mehrschichtig waren. Ich hob mit Vorteil von einer Schuppe zuerst kleine Epidermisschnitte ab und stellte dann benachbart die Versuchsschnitte so her, daß sie teils die

Epidermis allein, teils diese und Parenchym und anschließend, wo die Epidermis abgetragen war, das dadurch freigelegte Parenchym allein enthielten. In einigen Reihen zog ich außerdem mit der Pinzette noch lange Zipfel mit weiteren Oberhautzellen ab, wodurch die Mannigfaltigkeit der Nekrosebilder in solchen verwundeten, abgerissenen Oberhäuten vergrößert wird. Ich behandle das Färbeverhalten der Außenepidermis und des Parenchyms gesondert.

Auch bei der Fluorochromierung mit Akridinorange verhält sich die Außenepidermis spezifisch. Man bekommt die schönsten Färbungen im alkalischen Bereich (p_H 7—9). In den einzelnen c_H-Stufen ist hier die Färbung grundsätzlich ähnlich, nur quantitativ abgestuft. Sie steht im extremen Gegensatz zur Akridinorangefärbung der Innenepidermis: Die stumpfkupferrote Ionenfärbung der Vakuolen fehlt in lebenden Zellen völlig. Statt dessen sind die Zellsafträume der Konvexepidermis zart blaugrün oder grün bis grell gelbgrün gefärbt. Dabei zeigt sich stets am Rand der Präparate die schönste Zonung. Vom Schnittrand ausgehend, findet man die erste Reihe lebender Zellen mit leuchtend gelbgrünem Zellsaft. Die zweite Reihe fluoresziert meist grün und ebenso die weiteren Reihen des einschichtigen Schnitteiles. Etwa dort, wo nach innen zu das Parenchym beginnt, wird die Fluoreszenz schwächer, meist zart grün, und innen im mehrschichtigen Schnitt sind die Zellsäfte ganz zart dunkelgrün oder optisch fast leer.

Nur die vordersten, vorgeschobenen Epidermiszellen am Schnittrand — ich nenne sie „Vorpostenzellen" — sind orangegelb. Ihnen ähnlich sind oft die Vakuolenräume der Doppelsaumprotoplasten in der Wundrandzone. In kleinen abgetrennten Teilvakuolen vertieft sich hier die Farbe zuweilen bis zu roten Tönen.

An einem bestimmten, am Rande dünn auskeilenden Schnitt, traten in p_H 10,1 deutlich 4 Zonen in Erscheinung.

1. Die einzelligen, orangegelben „Vorpostenzellen"
2. Die leuchtend gelbgrünen, lebenden Zellen am Schnittrand; sie umgeben das Präparat ringsum als einreihig geschlossener Saum.
3. Die grasgrünen Zellen des einschichtigen Schnitteiles.
4. Die zartgrünen, fast farblosen Zellen der Innenzone. Zwischen diesen und den vorigen kann ein 1—2 Zellen breiter Streifen mit schwächerer, blaugrüner Zellsaftfluoreszenz eingeschaltet sein.

Ich gebe von 6 Versuchsreihen in abgestuften Phosphatpuffern eine wieder.

22. März. $p_H = 10,1$. Schöne Zonung am Schnittlängsrand. Erste lebende Reihe der Epidermiszellen leuchtend gelbgrün. Zweite und dritte Reihe grün. Unter der vierten beginnt hier das Parenchym. Es folgen ein bis zwei schwächer blaugrüne Zellreihen, dann das fast farblose, geschlossene Feld der Innenzone. — In den grünen Randzellen im einschichtigen Schnitteil ist die Vakuole grün, Kern und Plasma farblos, die Zellmembran farblos. Im Hellfeld wunderschöne Strömung in den vom Kern ausstrahlenden Plasmasträngen sichtbar. Auch im zartgrünen Innenteil der Epidermis sind Kern, Plasma und Membran dunkel. — In den leuchtend gelbgrünen Zellen am Schnittrand sind Kern und Plasma gleichfalls farblos. Die Zellen leben. Ihnen vorgelagert sind nur drei orangegelbe „Vorpostenzellen". In zwei weiteren liegen stark kontrahierte Vakuolen, die rotorangefarbige Blasen abgeschnürt haben.

$p_H = 9,5$ (?). Zonung am Rand ebenso schön. Vorposten gelb, dann ganzer einzellschichtiger Schnitteil lebhaft grasgrün. Innenfläche auch gefärbt, doch nur zart blaugrün. Die Grenze zwischen dem einschichtigen grasgrünen und mehrschichtigen zart blaugrünen Zellfeld verläuft scharf. — Im Hellfeld zeigen die Vorpostenzellen starke, die im UV grasgrünen Zellen schwächere gelbliche Vitalfärbung. Stark vergrößert, zeigen die *blaugrünen Innenzellen schwächere Plasmaströmung, die grasgrünen des einschichtigen Teils viel Plasmastränge und verstärkte Plasmaströmung*, auch in den „grellgelben" Vorposten strömt noch Plasma.

$p_H = 8,8$. Ganz wie früher, Randreihe grell gelbgrün, Epidermis im Innenfeld fast leer.

$p_H = 8,0$. Zonung am Schnittrand wieder ähnlich. Von außen nach innen folgen: grell gelbgrüne Zellen, durch leere tote unterbrochen, ein bis zwei Reihen grüne Zellen, eine Reihe teils grüner, teils dunkler, dann das Innenfeld mit fast dunklen bzw. zart graugrünen Zellen. Die schwache Fluoreszenz geht deutlich vom Vakuoleninhalt aus, Kern und Plasma sind dunkel. — Zellmembranen außen im toten Schnittrand (wie in den früheren Präparaten) rot, wo die lebenden Zellen mit gefärbtem Zellsaft beginnen, farblos.

Der Schnitt kommt in 0,8 mol Traubenzucker: Die Zellen des grasgrünen Randteiles plasmolysieren konvex. Die Zellen der farblosen Innenzone sind mehr konkav plasmolysiert. Sie zeigen bald leichte Systrophe, wobei deutlich wird, daß nur der Zellsaft, jetzt eingeengt, leicht blaugrün fluoresziert, Zellkerne und Plasmastränge dunkel sind. — In der Randzone sind die vordersten gelben Zellen noch ziemlich normal konvex plasmolysiert. Nur eine im UV grell gelbgrüne ist unplasmolysiert geblieben. Man sieht in ihr streckenweise an der Wand das im UV ziegelrote, tote Plasma. Doppelsaum-Protoplaste und normal plasmolysierte Randzellen sind im Farbton der Vakuolen ziemlich gleich; in der unplasmolysierten Zelle ist dieser intensiver. Die Zellkerne sind nur in Doppelsaum-Protoplasten zartgrün sichtbar, es färben sich also nur die toten Kerne der Randzone; der Raum zwischen Tonoplast und Plasmalemma ist übrigens optisch leer.

$p_H = 7,5$. Einschichtiger Randteil im UV gleichmäßig grün, Epidermiszellen innen leer bzw. ganz zartgrün, äußerste Randzellen gelbgrün. Im Hellfeld diese stark vital gelb gefärbt, Vakuole zerklüftet; *einschichtige Zone mit Plasmanetz und schöner, intensivierter Plasmaströmung*, Innenzone fast ohne Plasmaeffiguration.

$p_H = 6,4$. Gesamteindruck: weniger hell und bunt. Der einschichtige Randteil der Epidermis ist mäßig stark grasgrün, aber nirgends strahlend gelbgrün. Zellen des Innenfeldes farblos. Kern und Plasma fluoreszieren in den lebenden Zellen nirgends. Im Hellfeld haben die grasgrünen Zellen leicht

rosagefärbte Vakuolen und strömende Plasmastränge. Die Zellmembranen, im UV am toten Schnittrand rot, bleichen von außen nach innen etwas aus, sind aber rot bis an die lebenden Zellen; im lebenden grünen Außenfeld und im farblosen Innenfeld sind sie dunkel.

Zwiebelschuppen. Fluoreszenz-

Allium

vgl. S. 599	p_H um	Innenepidermis					
		Vakuole	Kern	Plasma	Membran innen	Membran am Schnittrand	Innen-zone
I	2,1	–	–	–	grüngelb	farblos grünlich	–
II	3,4	–	–	–	kupferrot	fast farblos	–
III	4,9	–	{ – zartgrün	–	kupferrot	lackgelb bis rot	–
IV	6,0	–	zartgrün	–	kupferrot	rot wie innen	–
V	6,35	–	zartgrün	–	{ kupferrot lackrot	stärker rot	–
VI	7,1	kupferrot	grün	blaugrün	grün	schmal feuerrot	+ – – zartgrün
VII	7,5	kupferrot	grün	blaugrün	grün	feuerrot	+ – zartgrün
VIII	8,0	stark kupferrot	grün	blaugrün	zartgrün	feuerrot	+ – zartgrün
IX	8,8	stark kupferrot	grün	blaugrün	zartgrün	feuerrot	+ zartgrün
X	10,1	dunkel kupferrot	grellgrün	blaugrün	farblos	feuerrot	+ zartgrün

$p_H = 4{,}9$. Keine Zonung am Schnittrand. Epidermis im einschichtigen Teil farblos, mit roten Membranen, Innenfeld farblos, Membranen bloß grünlich. Im toten Schnittrand Membranen rot, koaguliertes Plasma trüb graugrün, Kerne leuchtend grün.

färbung mit Akridinorange

cepa

Außenepidermis						vgl. S. 611
Vakuole			Kern und Plasma	Membran innen	Membran am Schnittrand	
Außenzone						
einschichtig	Randreihe	Vorposten und Tonopl.				
–	–	–	–	grüngelb	grüngelb	I
–	–	–	–	{ grünlich lackgelb	lackgelb	II
–	–	–		{ – lackrot	lackrot	III
{ – grün	–	–	–	{ – lackrot	lackrot	IV
+ – grasgrün	+ – gelbgrün	gelbgrün		{ – lackgelb bis rot	zartrot	V
+ grasgrün	+ gelbgrün	gelb	–	–	schmal feuerrot	VI
+ grasgrün	+ gelbgrün	gelb, orangestichig	–	–	feuerrot	VII
+ + grasgrün	+ + gelbgrün	{ grellgelb orange	–	–	feuerrot	VIII
+ + grasgrün	+ + gelbgrün bis gelb	{ grellgelb orange	–	–	feuerrot	IX
+ + grasgrün	+ + gelbgrün bis gelb	{ grellgelb orange	–	–	feuerrot	X

Auch die gelbgrüne Färbung der schnittrandnahen Außenepidermiszellen ist also c_H-abhängig und etwa auf den Bereich, wo die Innenepidermis rot angefärbt wird, beschränkt. Die rein grüne Färbung der Zellsäfte im einschichtigen Teil reicht aber weiter in den sauren Bereich. Die folgende Feinreihe, die ich am 7. Juli 1944 mit Schnitten derselben Zwiebel, von der die Innenepidermen (S. 605) stammten, durchführte, soll darüber Aufschluß geben, ob die Grün- und Gelbgrünfärbung der Epidermiszellen, von sauer nach basisch fortschreitend, bei gleicher c_H beginnt wie die kupferrote Ionenspeicherung in den Zellsäften der Innenepidermis. Im alkalischen Bereich (p_H 7,1—10,4) ergab sich weiter zunehmende und schließlich stärkste Randzonung.

Außenepidermis, Vakuole

p_H ungefärbt / gefärbt	Schnittrand mit Vakuolenblasen	Außenzone		
		Vorposten	Randreihe	einschicht. Zone
5,92 / 5,92	zart gelbgrün	zart gelbgrün	zart gelbgrün	+ − dunkelgrün
6,20 / 6,28	gelb	gelbgrün	zart gelbgrün	+ − dunkelgrün
6,45 / 6,48	gelb	gelbgrün	matt gelbgrün	dunkelgrasgrün
6.60 / 6,68	gelb	+ − gelb	matt gelbgrün	dunkelgrasgrün
6,75 / 6,85	gelb mit orangegelbem Stich	+ − gelb	matt gelbgrün	grasgrün
6,95 / 6,96	orange	+ − gelb	gelbgrün	grasgrün

Was nun die Deutung der Färbungseffekte in den Schnittrandzellen betrifft, so entspricht die leuchtend gelbgrüne Färbung etwa der Fluoreszenzfärbung der undissoziierten Akridinorangemoleküle. Zwei Annahmen sind möglich. In den Saumzellen kann der Zellsaft so stark alkalisch geworden sein, daß der Fluoreszenzindikator Akridinorange seinen Umschlagspunkt überschritten hat (vgl. Strugger 1940, S. 115), oder das Akridinorange ist mit

den lipoiden Zellsaftstoffen (nach D r a w e r t freien Fettsäuren) eine Verbindung eingegangen, die in ihren Fluoreszenzeigenschaften denen der Farbbase ähnlich ist.

Ich zögerte anfangs, eine Entscheidung zu treffen — doch läßt sich die erste Annahme ausschließen, und zwar aus folgenden Gründen:

1. Elektroneutrale Moleküle sind permeierfähig und müßten den Zellen beim Auswaschen im ungefärbten Phosphatpuffer verlorengehen (vgl. die NH_3-Versuche des folgenden Abschnittes). Das Wundrandphänomen erhält sich aber auch nach vielstündigem Bad der Schnitte in den ungefärbten Pufferlösungen.

2. Dort, wo am Schnittrand in den Vorpostenzellen und isolierten Tonoplastenblasen die Gelbfärbung am intensivsten ist, gesellen sich vielfach orangerote und rote Farbentöne hinzu, die auf die Gegenwart von Farbkationen hinweisen. Solche gibts aber, soweit wir wissen, nur in saurer Lösung (p_H kleiner als 6,5), sie schließen die Annahme alkalischer Reaktion im Zellsaft aus.

Von der grünen Färbung des einschichtigen Schnitteils vermitteln Übergänge zur gelbgrünen der Randreihe und gelben der exponierten Zellen und der überdauernden Vakuolenblasen. Niemals aber weisen die Zellsäfte l e b e n d e r Außenepidermiszellen die kupferrote Färbung der polymeren Kationenfärbung auf! Darin liegt der stärkste Unterschied gegen Innenepidermis und Parenchym.

Ich habe auf diesen Punkt dauernd geachtet. Meist gibt es nur in den von überdauernden Tonoplasten umkleideten Vakuolenblasen am äußersten Schnittrand rot und rotmischfarbig fluoreszierende Zellsäfte. Liegen in einem Doppelsaumprotoplasten eine große Hauptvakuole und abgeschnürte kleine Blasen, so sind die letzteren meist stärker rot gefärbt, was offenbar mit ihrer größeren relativen Oberfläche zusammenhängt. Beim Zellsaft der spärlichen, einzelliegenden orangegelben „Vorpostenzellen“ handelt es sich um eine gelbrote Mischfarbe. — Man muß in all diesen Fällen annehmen, daß erst, wenn bei starker Farbstoffaufnahme die ganze den Farbstoff bindende Substanz des Zellsaftes abgesättigt ist, ein Überschuß an Akridinorange mit der roten Farbe der polymeren Kationen in Lösung gehen kann. Solche Rot- und Orangefärbung ist in der Konvexepidermis ein Kennzeichen der pathologischen Wundrandprotoplaste bzw. -tonoplaste und auf diese beschränkt.

Eine verstärkte Farbstoffspeicherung schnittrand- bzw. wundrandnaher Zellen ist in der Vitalfärbungsliteratur aus sehr zahlreichen Beispielen bekannt (K ü s t e r 1911, 1918 b, 1933 u. a.,

Collander 1921, Strugger 1936, 1940, 1941, Czaja 1936, Drawert 1938, S. 183, 198, 1941, S. 47, Bukatsch 1940 u. a.). Beim Akridinorange kommt der typische Farbwechsel hinzu.

Auf meine Beobachtungen über das Färbeverhalten der Zellmembranen gehe ich nur kurz ein, um den Umfang dieses Beitrages nicht zu sehr anschwellen zu lassen. Nicht alle Beobachtungen fügen sich den Angaben der Tabelle, die das gewöhnliche Verhalten wiedergibt. Hervorgehoben sei, daß die rote Färbung auch im alkalischen und neutralen Bereich sich wiederfindet, doch nur am Rande der Schnitte, soweit die Zellinhalte getötet sind. Wo die ersten lebenden und speichernden Protoplaste beginnen, sind die Zellwände meist völlig farblos.

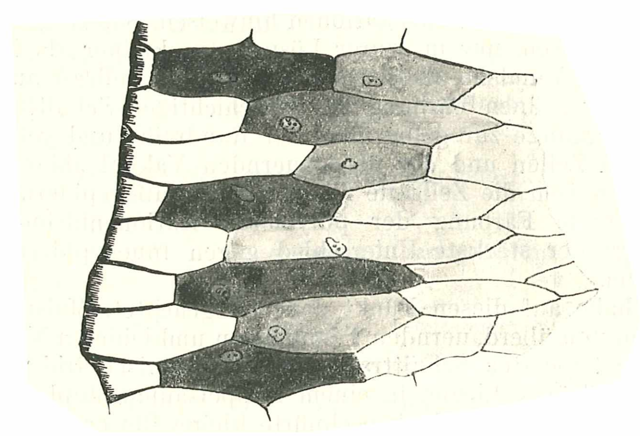


Abb. 5. Außenepidermis, Randphänomen in 1/1000 KOH (dunkel: grellgelb, halblicht: matt grasgrün, licht: nicht oder fast nicht fluoreszierend).

Eine Erscheinung besonderer Art ist die feuerrote Membranfärbung, welche die Randfetzen und äußersten Wundränder auszeichnet („Schnittrandphänomen"). An scharfen Schnitträndern ist schön zu beobachten, daß diese grellrote Färbung nur eine gewisse Strecke weit in die Membran hineinreicht und dann spitzwinkelig auskeilt. Dabei fällt oft die gleiche Länge dieser feurigen Membranzungen in allen benachbarten angeschnittenen Zellwänden auf (vgl. Abb. 5). — Im schwach sauren Bereich ($p_H \geqq 6$) sah ich die Membranen rot im toten Randteil der Schnitte, (weißgelb im lebenden Areal), hier speichern die Protoplaste nicht und lassen den Zellwänden Farbstoff übrig.

Abb. 5 zeigt die verstärkte Membranfärbung und das Zonungsphänomen an einem Schnittquerrand. Der Schnitt war 24 Stunden in n/1000 KOH (nach Schindler, 1938 a, lebensunschädlich) vorbehandelt und dann wie gewöhnlich in Akridinorgange, p_H um 8,4, gefärbt. Die Zonung ist ganz so wie in direkt gefärbten Schnitten: alle lebenden Protoplasten, die in das tote Feld vorragen und weniger als eine halbe Zelle vom Schnittrand entfernt sind, zeigen die leuchtend gelbgrüne Zellsaftfluoreszenz, die $^1/_2$—1 Zelllänge entfernten vordersten Protoplasten jeder Zellreihe zeigen mäßig matt grasgrüne Farbe, die weiteren Protoplasten sind dunkel geblieben.

An plasmolysierten Schnitten der Konvexepidermis kann man die gleichen Zonungseffekte unvermindert schön wiederfinden. Ich habe auch die Methode gleichzeitiger Plasmolyse (Schindler 1938 a, b) angewandt, d. h. die Schnitte direkt in eine Lösung von 0,8 Traubenzucker + $^1/_{10000}$ Akridinorange bzw. 0,6 KCl + Farbstoff eingetragen und nach 15 Minuten im reinen Plasmolytikum ausgewaschen und beobachtet. Solche Lösungen wurden auch mit Wiener Leitungswasser (p_H um 7,8) hergestellt.

In derart bereiteter Zucker-Farblösung färben sich die Zellwände rot, sehr intensiv zumal in den toten Zellen und im einschichtigen Schnitteil. Die grünen, plasmolysierten Protoplaste heben sich vom roten Grunde schön ab. Die lebenden Randzellen sind intensiver grün. Die Zellkerne heben sich dunkel gegen die Vakuolen ab, sie sind optisch leer und erscheinen als farblose Löcher im grünen Feld.

An Epidermiszipfeln, die man mit den Schnitten abgezogen hat (S. 612), findet sich eine bunte Mannigfaltigkeit schönster Wundnekrosen. In den toten Spitzen der Zipfel fluoresziert die tote Zellmembran feuerrot. Die ersten eingeschalteten lebenden Epidermisprotoplasten mit erhaltenem Zellsaft sind gelb, ebenso die überdauernden Tonoplastenblasen und die kontrahierten Doppelsaumprotoplasten. Die Gelbfärbung des Vakuoleninhaltes entspricht starker Schädigung. Nur abgeschnürte kleine Zellsaftperlen im toten Doppelsaum sind wieder orange bis rot (Abb. 6). Benachbarte Zellen der besser erhaltenen Zone des Schnittes sind gelbgrün bis grün.

Ein Schwesterschnitt aus 0,6 KCl + $^1/_{5000}$ Akridinorange (im Leitungswasser) ist makroskopisch im Tageslicht chromgelb, am Saume orange (während die ganzen Zuckerschnitte orangerot sind). Im UV-Licht sind die Zellmembranen ungefärbt.

Die plasmolysierten Epidermisprotoplasten im Schnittinneren sind größtenteils ungefärbt geblieben. Am Schnittsaum zeigen sich schöne Randnekrosen. „Kappenzone“ und Randzone (S. 597) sind nach der Fluorochromierung mit Akridinorange prächtig differenziert. Die Zellen des einschichtigen Schnitteiles (der etwa der Kappenzone entspricht) sind zartgrün. In den Doppelsaumprotoplasten der Randzone sind die Zellsäfte gelb, abgeschnürte Vakuolenperlen leuchten orange. Oder die Hauptvakuole ist gelbgrün, die Teilvakuolen sind greller gelb. Im Hellfeld sind beide gleich gefärbt, im UV-Licht sind sie differenziert. Im abgezogenen Zipfel leuchtet in unplasmolysierten, für das Salz nicht mehr halbdurchlässigen Zellen der Vakuoleninhalt gelb oder grün. Im



Abb. 6. Außenepidermis, nekrotische Randzelle, Hauptvakuole fehlt, die Vakuolenblasen fluoreszieren r o t.

Doppelsaumprotoplasten sind die Kerne überall in zarter oder lebhafter grüner Farbe sichtbar. Auch völlig tote Kerne der Doppelsaumzone fluoreszieren grün und nicht rot. Oft leuchtet in derselben Zelle der aufgequollene Kern g r ü n, das tote Plasma ringsum und die perlschnurartig erstarrten Hechtschen Fäden, die vom Kern zum Plasmalemma gespannt sind, z i e g e l r o t; ebenso fluoreszieren tote Hechtsche Fäden im „Vorraum“.

Flächenschnitte, die man erst in 0,6 n reiner KCl vorplasmolysiert und nachher ins gleich stark hypertonische KCl-Farbbad übertragen hat, zeigen gleiche Färbung in geschwächter Intensität.

Daß die Adsorptionsfärbung der Zellwände ausbleibt, wenn das hypertonische Farbbad Salz anstatt Zucker als plasmolysierendes Agens enthält, beruht auf Adsorptionsverdrängung bzw. auf „blockierender“ Wirkung der Salzkationen. Darüber besteht in bezug auf die Hellfeld-Vitalfärbung ein reiches Schrifttum (P f e f f e r 1886, I r w i n 1922 f, D r a w e r t 1937 a, b, B o r r i s 1937, K e r s t i n g 1937, P e k a r e k 1938, R e h m 1938, H ö f l e r und S t i e g l e r 1947 u. a.).

c) Parenchym.

Die Flächenschnitte von der Konvexseite der Zwiebelschuppen umfassen stets unter der Epidermis auch eine oder mehrere Lagen von Parenchymzellen. Diese reagieren ganz anders auf die Akridinorangefärbung als die Zellen der angrenzenden äußeren Epidermis und im ganzen ähnlich wie die der inneren Epidermis. Gleiches gilt übrigens für ihr Verhalten bei gewöhnlicher Vitalfärbung. Ich zeige in meinem Protoplasmapraktikum seit 1930 den Gegensatz in der Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen, indem ich nicht Außen- und Innenepidermis der Zwiebel, sondern Außenepidermis und angrenzende Parenchymzellen im selben Schnitt vergleiche.

Daß diese letzteren soviel weniger verwendet werden als die Häutchen der Innenepidermis, wird begreiflich wegen ihres viel ungleichmäßigeren Verhaltens im Färbeversuch, das einerseits durch die ungleiche Schnittdicke und den gehemmten Zutritt der Farbstoffe zu den inneren Zellagen, anderseits durch die Wundphänomene der durch den Schnitt irritierten Zellen bedingt ist. Im Akridinorange wird freilich gerade dadurch die Buntheit der Färbungseffekte noch größer. Im UV-Licht zeigen die Parenchymzellen im schwach alkalischen und neutralen Bereich rote, nach innen zu aber auch rotgraue, graugrüne, gelblichgraue Zellsäfte nebeneinander, und der „Konzentrationseffekt“ der Ionenfärbung (S t r u g g e r) tritt an solchen Präparaten aufs anschaulichste hervor. G e s ä t t i g t e G r ü n- u n d G e l b f ä r b u n g (S. 612) f e h l t, sie gehört nicht in die Farbskala der Ionenfärbung. Die Rotfärbung der (polymeren) Kationen kommt in der p_H-Reihe von den gleichen Schwellen an vor wie in der Innenepidermis. Ein auffälliges Phänomen ist die leuchtend feuerrote Vakuolenfärbung lebender Randzellen, die, einzeln an den Schnitträndern liegend, stark ins Auge fallen. Der Gegensatz zur Epidermis ist frappant. Dort fluoreszieren die wundrandnahen Zellen grell gelbgrün, im Parenchym dagegen feuerrot. Zum Studium dieser überfärbten Randzellen eignet sich das Parenchym noch besser als die Innenepidermis[8]. Die intensive Anfärbung tritt nur im alkalischen Bereich ein. Bezüglich der c_H-Abhängigkeit beobachtete ich z. B. leuchtend feuerrote Färbung bei p_H 10,5 bis 8,0, matter kupferrote

[8] C o l l a n d e r (1921, S. 364) hat im Zwiebelparenchym solche abnormal kräftig gefärbte Zellen auch in Sulfosäure-Farbstoffen beobachtet und gezeigt, daß ihr osmotischer Wert gegenüber normalen, ungefärbt gebliebenen Zellen abgesunken war und daß sie nicht mehr normal deplasmolysierbar, also krankhaft verändert waren. — Vgl. D r a w e r t, 1941, S. 24 f.

bei 7,5 bis 6,8, während bei 6,1 und darunter die Randzellen nicht hervortraten.

Die Zellkerne sind in allen toten Zellen grellgrün, in den lebenden leuchten sie zartgrün, auch grüngelb, sie reagieren ähnlich wie in der Innenepidermis. In Zellen mit intensiverer Vakuolenspeicherung bleiben die Zellkerne vielfach farblos und öfter als dort sieht man die Kerne sich dunkel gegen die Vakuole abheben, selbst in nur schwach graurot fluoreszierenden Protoplasten. Die Vakuolen zeigen manchmal starke Kontraktion, die aber naturgemäß nie so gleichmäßig wie in der Innenepidermis erfolgt; sie ist mit verstärkter Blaugrünfluoreszenz des Protoplasmas (vgl. S. 601) und lebhafter Grünfärbung der Kerne verbunden.

Die Färbung der Zellmembranen des Parenchyms ist ähnlich c_H-abhängig wie in der Innenepidermis. Die Zellwände leuchten in toten Schnitteilen lebhaft rot im alkalischen Bereich (gesättigt grellrot am Schnittrand), rot bis p_H 6, im allgemeinen lackrot bis p_H 4, grünlich und lackgelb, auch grell weißgelb um den IEP (p_H 3), weißgrün oder höchstens gelblichweiß um p_H 2. Wo die Vakuolen lebender Zellen speichern, bleiben die Zellmembranen gewöhnlich farblos. Die Speicherkonkurrenz schafft mannigfach abgestufte Bilder der Fluoreszenzfärbung[9].

IV. NH_3-Einwirkung.

Versuche, worin ich verdünnte NH_3-Lösungen auf gefärbte Zwiebelschnitte einwirken ließ, fesselten mein Interesse. Schindler (1938, S. 188, 199) hatte in meinem Institut die Resistenzschwellen und Nekrosen von Allium- und Spirogyrazellen in Ammoniak, Plaß (1942) dessen aufquellende Wirkung auf Diatomeen-Plastiden ausführlich untersucht.

Der Ammoniak permeiert, wie uns seit de Vries (1871) bekannt, durch das lebende Protoplasma. Er macht die Zellsäfte reversibel alkalisch, was im Farbumschlag anthocyanhältiger Zellen deutlich wird. Natürlich permeiert auch hier nicht der ionisierte, sondern der undissoziierte Anteil der Moleküle, und

[9] Die rote Fluoreszenzfärbung der Zellwände des Parenchyms beruht wie die der Innenepidermis auf Elektroadsorption der Akridinorange-Kationen. — Davon ist ein grelles, intensives Rotleuchten einzelner Membranteile toter oder nekrotischer Zellen im UV-Licht (das „Alpenglüh-Phänomen“ meiner Protokolle) zu unterscheiden, das wahrscheinlich auf andere Weise, nämlich durch Farblackbildung mit von der Membran aufgenommenen Zellstoffen (vgl. Brauner 1933) zustandekommt; es findet sich in Zellen des Parenchyms und der Innenepidermis.

Collander, Turpeinen und Fabritius (1931, S. 358) haben die Permeationskonstante des Ammoniaks bei *Rhoeo* auf etwa 200—2000 bestimmt.

Ich hatte gehofft, durch NH_3 die stumpfkupferroten, ionengefärbten Zellsäfte der Innenepidermis und des Parenchyms alkalisch machen[10] und dabei das Schicksal der kupferroten, vermutlich polymeren Akridinorange-Ionen verfolgen zu können, sie womöglich zu depolymerisieren und zu gelbgrün leuchtenden Basenmolekülen umzuwandeln. Schon meine ersten Versuche brachten indes Beobachtungen anderer Art, die zu verfolgen waren.

Ich verwendete Präparate der Innenepidermis, die in gewohnter Weise mit gepufferter Akridinorangelösung 1 10.000 vom p_H 7,5, 8,0, 8,75, 10,1 durch 10—15 Minuten vorgefärbt und im ungefärbten Phosphatpuffer ausgewaschen waren. Der Farbzustand der Schnitte wurde entweder vor der NH_3-Einwirkung im UV-Licht direkt beobachtet oder in anderen Versuchen, um die Vorbestrahlung zu vermeiden, an gleichen Schnitthälften kontrolliert. Die Zellsäfte waren wie gewöhnlich gleichmäßig kupferrot, die Vakuolen kontrahiert, die Zellmembranen farblos bis grünlich. Ich brachte die Präparate in ein Fläschchen mit n/100 NH_3[11] und beobachtete nach einigen Minuten unter Deckglas im UV-Licht: Ein Farbumschlag war in den Vakuolen nirgends eingetreten, sondern die Zellsäfte waren entfärbt, die Zellmembranen kupferrot angefärbt. Die Präparate waren von in schwach saurem Farbbad behandelten dadurch verschieden, daß die Zellkerne überall in leuchtend grüner Farbe hervortraten.

Der Ammoniak treibt das Akridinorange aus der Vakuole in die Zellmembran. Der Farbstoff zeigt vorher im gelösten und nachher im elektroadsorbierten Zustand die kupferrote Färbung der Kationen.

Natürlich wird primär das Akridinorange, wenn der Zellsaft alkalisch wird, zur (molekularen und lipoidlöslichen) Farbbase

[10] M. Irwin (1925) hat schon festgestellt, daß der basische Farbstoff Brillantcresylblau von lebenden Nitella-Zellen, welche ganz geringe NH_3-Mengen (z. B. 0,00014 mol) im Zellsaft enthalten, schwächer und langsamer gespeichert wird als von den Kontrollen. Vorangegangen waren ähnliche Beobachtungen von Mc Cutcheon und Lucke (1924); sie wiesen eine verlangsamte Farbspeicherung nach, wenn der p_H-Wert des Zellsaftes durch NH_4OH-Aufnahme erhöht worden war. Vgl. zumal die Permeabilitäts-Monographie von Brooks (1941, S. 147).

[11] Für die Vorbereitung und Einstellung der NH_3-Lösungen für alle Versuche dieses Abschnittes sage ich meinem Assistenten Dr. Karl Kuchar herzlichen Dank.

umgewandelt und diese exosmiert durch das lebende Protoplasma. Doch überrascht der Befund, daß die Zellulosewände, die durch das NH_3 wohl verstärkt negativ aufgeladen sind, den Farbstoff außen so rasch wieder an sich reißen und elektroadsorptiv in Ionenform festlegen, trotz der stark alkalischen Reaktion der umspülenden Lösung.

Besonders anschaulich gestaltet sich der Versuch, wenn man das NH_3 auf die gefärbten Protoplaste im plasmolysierten Zustande einwirken läßt. Ich behandelte Innenepidermisschnitte 10 Minuten mit Akridinorange vom p_H um 8,0, wusch im Phosphatpuffer aus, brachte sie in 0,8 mol Traubenzucker (im Puffer gelöst) und überführte, nachdem hier normale Plasmolyse eingetreten war, in 0,8

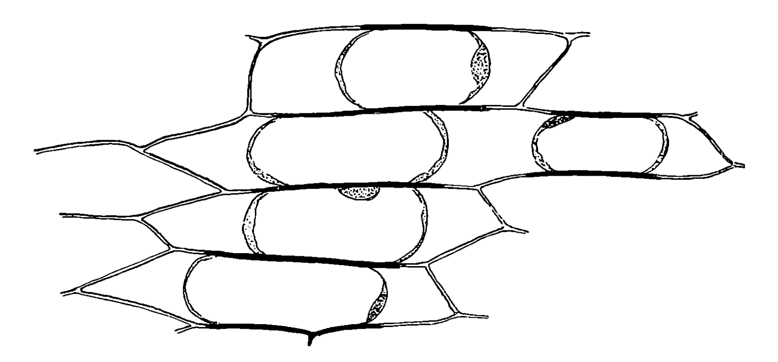


Abb. 7. Innenepidermis. NH_3 hat das Akridinorange aus den Protoplasten (vgl. Abb. 4) in die anliegende Zellwand getrieben; diese r o t.

Traubenzucker, in n/100 NH_3 gelöst. Wiederum wird der Farbstoff binnen kurzer Zeit in die vordem farblosen Zellwände getrieben. In schöner Weise zeigt sich dabei, daß nur die Teile der Zellwand, denen der Protoplast anliegt, das rote Akridinorange adsorptiv festlegen. Der übrige Membranteil bleibt farblos. Neben den Protoplasten keilt die Rotfärbung der Membran allmählich aus (Abb. 7). Auch Teile der Zellängswände, denen von einer Seite her ein Protoplast anliegt, färben sich rot. Das Präparat wurde am 30. Juni nach dem Färben und Auswaschen, ohne der UV-Strahlung ausgesetzt zu sein, in 0,8 mol Traubenzucker (im Puffer gelöst) plasmolysiert und nach 11 Minuten im UV-Licht beobachtet. Es herrschte schöne, meist noch konkave Plasmolyse und kupferrote Zellsaftfärbung. Nach weiteren 5 Minuten kam der Schnitt in ein Fläschchen mit 0,8 Traubenzucker + n /100 NH_3 und nach $1^3/_4$ Mi-

nuten unters Mikroskop. Die Entfärbung der Vakuole war voll im Gang, viele zuvor rote Protoplaste waren grau und fast leer und zeigten im Inneren rote, 1—4 μ große Fällungskügelchen in BMB, die binnen 4 Minuten zu größeren zusammenflossen und nachher meist verschwanden. Andere Zellsäfte waren ganz entfärbt und die Zellmembranen, wie Abb. 7 zeigt, lokal neben den Protoplasten rot tingiert. Die Skizze wurde 6—16 Minuten nach dem Eintragen in NH_3 von Dr. Schindler aufgenommen. Die Protoplaste runden sich in der NH_3-Zuckerlösung rasch konvex ab.

Die Zellkerne leuchten in den mit NH_3 behandelten Zellen viel intensiver grün als zuvor. Das Akridinorange, das nach Strugger am negativ geladenen Eiweiß adsorptiv festgelegt werden soll, wird durch NH_3 nicht vertrieben, sondern, nach der Intensität der Fluoreszenz zu schließen, werden noch größere Farbstoffmengen an den Kernen festgelegt, und zwar unter Beibehaltung des rein grünen Farbtones. Man kann beobachten, wie sich die vorher schwache Grünfärbung in den ersten Minuten der NH_3-Wirkung lebhaft verstärkt. Deutlich blaugrün fluoresziert auch das Cytoplasma, das in unplasmolysierten Präparaten die Endzwickel zwischen Tonoplast und Zellwand erfüllt und nach Plasmolyse dünne Kappen um die beiden konvexen Menisken bildet.

Auch die Entfärbung der Zellsäfte läßt sich im UV-Mikroskop direkt beobachten, wenn man die Präparate nach hinreichend kurzer NH_3-Einwirkung dahin bringt. Nur wird in der dünnen Flüssigkeitsschicht unter Deckglas der NH_3-Zutritt und seine Wirkung auf die Zellen verzögert. Man bringt also am besten gleiche, gefärbte Schnitte für verschieden lange Dauer in die NH_3-Fläschchen. Schon nach 1—1$^1/_2$ Minuten ist die Umlagerung meist zum Hauptteil vollzogen, nach 2 Minuten fand ich sie völlig perfekt, die Zellsäfte leer, die Membranen rot, die Zellkerne leuchtend grün.

Die Umlagerung ist ebenso reversibel wie die Neutralrotverlagerung aus dem Zellsaft in die Zellmembran, die im Struggerschen Versuch (1936) bei Übertragung der Zellen aus alkalischem in saures Milieu erfolgt. Der Schnitt, dem die in Abb. 8 gezeichneten Zellen angehören, war unplasmolysiert und unbestrahlt in n/100 NH_3 gebracht und nach 2 Minuten kurz beobachtet worden. wobei sich der Verlagerungsprozeß als abgeschlossen zeigte. Nach weiteren 2 Minuten kam er in 0,8 mol Traubenzucker im Phosphatpuffer. Nach 15 Minuten war hier die Plasmolyse teils konvex perfekt, teils leicht hantelförmig. Die Zellsäfte waren jetzt wieder rot gefärbt, die Zellwände entfärbt. Die

Vitalität der Membranfärbung und Rückverlagerung ist hier durch die Plasmolyse bewiesen. Nach Exosmose des NH_3 gewinnt der — wieder saure — Zellsaft sein Speichervermögen für die Akridinorange-Ionen zurück. Die meisten Zellen waren normal und sahen aus wie die obere Zelle in Abb. 8. Vereinzelt finden sich im Präparat abnormale, geschädigte Protoplaste (Abb. 8 unten), in denen

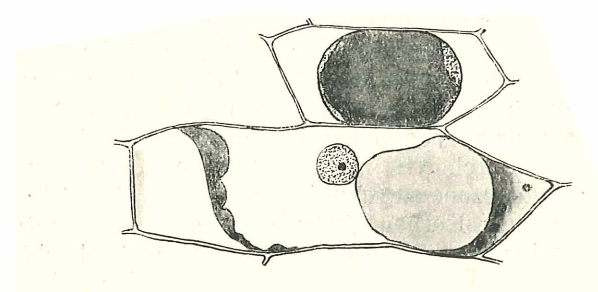


Abb. 8. NH_3-Wirkung. Oben normale Zelle, unten Nekrose; vgl. Text (dunkel: rot, punktiert: grün).

der Zellsaftraum farblos geblieben ist, während der Farbstoff mit leuchtend roter Fluoreszenzfarbe vom toten Plasma, das der Kontur schollig anhaftet, aufgenommen wurde. Der Kern hat seine Grünfärbung — wie immer in ähnlichen Fällen — behalten, nur die Nukleoli sind rot gefärbt. Die Differenzierung des Nukleolus bei Fluorochrombehandlung ist von vielen Autoren beobachtet

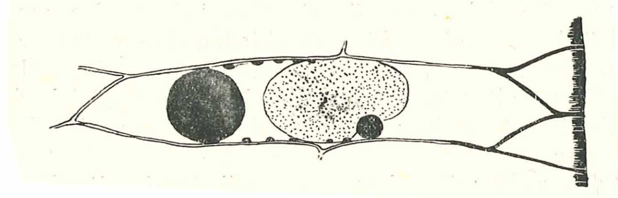


Abb. 9. Gequollener Riesenkern in NH_3, grün fluoreszierend.

worden (Haitinger, Strugger, Bukatsch). Nach NH_3-Einwirkung begegnet man solchen grünen Zellkernen mit roten Nukleoli bei Innen- und Außenepidermiszellen regelmäßig in recht weitem p_H-Bereich.

Zumal in den dem Schnittrand nahen Zellen fand sich die noch nicht beschriebene, in Abb. 9 wiedergegebene Nekroseform der Zellkerne, die für die NH_3-Wirkung höchst charakteristisch ist. Die Zellkerne sind auf das Vielfache ihres ursprünglichen Volumens

aufgequollen und haben dabei scharfe, kugelkonvexe Rundung erhalten. Die sichtlich toten Kerne bewahren auch immer ihre blaugrüne Fluoreszenzfarbe. Sie sind dadurch im UV-Licht sehr deutlich wahrnehmbar. — Ihre glasartige Transparenz im Hellfeld mag schuld daran sein, daß diese auffälligste Kernverquellung, wie es scheint, noch nicht beobachtet wurde. In der abgebildeten Zelle finden sich nur einige kontrahierte Vakuolenblasen und längs der Zellwand ein paar tote, akridinorötende Plasmaklümpchen.

Als ich den Versuch an einem Schnitte gleicher Herkunft, der bloß nach der Färbung viel länger, etwa 3 Stunden, im Phosphatpuffer ausgewaschen worden war, wiederholte — ihn direkt in 0,8 mol Traubenzucker plasmolysierte, beobachtete, nach 14 Minuten in NH_3-Traubenzucker überführte und nach weiteren 12 Minuten zurück in Zucker brachte —, zeigte sich ein ähnliches Bild und nur ein größerer Hundertsatz solcher riesenhaft aufgequollener nekrotischer Zellkerne. Sie sind im Hellfeld unsichtbar

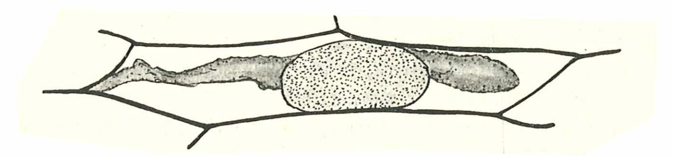


Abb. 10. Gequollener Kern grün, koaguliertes Plasma rot.

oder nur in ihrer ausbuchtenden Wirkung auf die Tonoplasten erkennbar. Die grünen Kerne in den überlebenden Zellen des Schnittes sind klein geblieben, sie hatten schon im Ammoniak eine prächtige Entmischung, ein derbmaschiges Netzwerk von Chromatin gezeigt, zwischen dem farblose Lücken ausgespart waren. Dieses künstlich vergröberte Pseudospirem blieb nachher im NH_3-freien Zucker erhalten. Das Bild weist darauf hin, daß auch nach NH_3-Behandlung normalerweise nur die Karyotinphase das Akridinorange adsorptiv speichert. In den verquollenen Riesenkernen gibt es dagegen keine Spur einer Karyotindifferenzierung, die Gesamtmasse leuchtet grün und erscheint gleichmäßig durchmischt. Alle Kerne bleiben, wie erwähnt, nach der NH_3-Behandlung grün, es gibt keine akridinorötenden Kerne im Präparat. Im Hellfeld erscheinen die kleinen, maschigen Kerne derb graugelb vital angefärbt, die aufgequollenen wieder farblos.

Der Farbton des Plasmas ist zum Großteil auch grün und hier dem der Kerne recht ähnlich. Zapfen lebenden Plasmas (ähnlich den bei Drawert 1939, S. 197, Photo 11 abgebildeten) sind zart blaugrün. Getötetes Plasma ist intensiv dunkelblaugrün.

Die NH_3-Versuche zeigen klar, daß sich nicht alle getöteten Anteile des Protoplasmas mit Akridinorange rot färben. Struggers Ansicht (1940, S. 120), daß „bei jeder Art der Tötung vorgefärbter Epidermiszellen eine Umfärbung der toten Protoplasten nach Kupferrot in Erscheinung tritt", läßt sich also nicht aufrecht halten.

Um die Neigung der NH_3-Nekrosen zur Grünfärbung mit Akridinorange unter Beweis zu stellen, habe ich gleiche, durch Ammoniak partiell getötete Schnitte einem zweiten Farbbad von 10 Minuten unterworfen. — Ein wie gewöhnlich gefärbter Schnitt kam nach 8 Minuten Aufenthalt in n/100 NH_3 ohne Plasmolyse zurück in den farblosen Puffer und wurde nach 30 Minuten im UV-Licht betrachtet. Es fanden sich sehr viele grüne verquollene Riesenkerne, die $^1/_4$—$^1/_3$ des Lumens ihrer Zelle einnahmen und meist noch scharf konvex begrenzt waren, nur hie und da zerfließend den Großteil des Zellumens von einem Zellpol bis zum anderen mit leichter Abschattung grün färbten. Neben den distinkt erhaltenen Kernriesen lag totes, grün fluoreszierendes Plasma. Der partiell getötete (und 6 Minuten im UV-Licht betrachtete) Schnitt kam jetzt zur Nachfärbung neuerlich für 10 Minuten in 1 10.000 Akridinorange p_H 8,0 und dann wieder in den farblosen Phosphatpuffer: in einem Teil der Zellen war jetzt das tote Plasma kupferrot geworden. Die Kerne waren aber fast alle noch grün, bloß in wenigen Randzellen rot. Im Hellfeld waren die letzteren klein, geschrumpft und intensiv gelb tingiert, die ersteren, wenig vergrößerten, ungefärbt. Es gab auch gleichsam fixierte, d. h. zu gewölbten, schüsselförmigen Scheiben verkleinerte („Campylodiscus-ähnliche") Kerne, die im zweiten Bad ihre Grünfluoreszenz erhalten hatten. Auch alle verquollenen Riesenkerne waren grün geblieben. Mehrfach hatte sich aber neben ihnen das tote, im Hellfeld sichtlich koagulierte Plasma zart rot nachgefärbt. Eine solche Zelle ist in Abb. 10 dargestellt. Der tote, konvexe Zellkern ist grün, das tote Plasma rot! — In vielen anderen Zellen war aber auch das tote Plasma auch nach dem zweiten Farbbad grün geblieben wie vorher.

Von besonderem Interesse ist in den NH_3-Versuchen das Verhalten der Tonoplasten. Ich färbte die Innenepidermen mit Akridinorange in stärker akalischem Puffer und führte nach dem Auswaschen NH_3 zu wie in den früheren Versuchen. Die Versuche erfolgten im März. Faßte ich Teile der Schnitte ins Auge, wo die Vakuolenkontraktion etwas stärkere Grade erreicht hatte, so daß deutlich konvexe Tonoplastenbögen vor den zugespitzten Zellenden lagen, so sah ich bei der NH_3-Einwirkung auch die Tono-

plastenrundungen grellrot werden. Das Ammoniak treibt in diesem Falle den roten Farbstoff aus der Vakuole zum Teil in die derb gewordenen Tonoplastenhäute. — Es sind vor allem degenerierende Zellen, worin sich bei der Ammoniakbehandlung auch die freien Tonoplastenmenisci rot anfärben; und auch in nicht plasmolysierten, bloß vakuolenkontrahierten Präparaten werden, zumal wenn vorher ein stärker alkalisches Farbbad (p_H 9—10,4) eingewirkt hat, die verschärften Vakuolenwände im NH_3 rot. Nach Plasmolyse wird der Vorgang um so anschaulicher. Der Zellsaft entfärbt sich, die angrenzende Zellwand und die Tonoplastenwölbungen nehmen den Farbstoff auf.

Die gleiche rote Tonoplastenfärbung hat erstmalig Strugger (1940, S. 127) für akridinorangegefärbte und dann mit KCNS und NH_4CNS behandelte Zellen der Zwiebelinnenepidermis beschrieben. — Ich bin nach Beobachtung zahlreicher Präparate zum Urteil gelangt, daß die primären, bei der Vakuolenkontraktion in Erscheinung tretenden Vakuolenwände das Akridinorange niemals speichern. Solche „lebende Tonoplasten“ haben Lederer im Hellfeld und Strugger (1940c, 1941) durch Fluorochromierung mit Lipoidfarbstoffen (Neutralrot, Benzoflavin) färberisch darzustellen vermocht. Das an der Eiweißphase adsorbierbare Akridinorange wird erst in einem sekundären und wohl immer reversibel veränderten Zustand von Tonoplasten gespeichert; man möchte meinen, daß wohl eine eiweißähnliche Protoplasmakomponente auch die derbe Verfestigung der Tonoplasten bei der Nekrobiose bedingt. Die Vorstellung steht im Einklang mit Lederers Fixierungsergebnissen und keineswegs im Widerspruch mit Struggers Beobachtungen (1940, S. 123—127), wonach die Akridinorangefärbung von Tonoplast und Plasmalemma in Zellen erfolgt, bei denen in den Rhodaniden eine Kappenplasmolyse zweifellos irreversiblen, wahrscheinlich nekrotischen Charakters eingetreten ist. —

Entmischungsversuche mit Sodalösung, die ich gemeinsam mit Schindler an Präparaten derselben Zwiebel orientierend durchführte, bestätigten meine Deutung der akridinorötenden Tonoplasten. Ich behandelte akridinorangegefärbte Protoplaste mit kupferrot fluoreszierendem Zellsaft mit stark hypertonischer n-Sodalösung. In allen Zellen trat eine starke Tonoplastenbildung ein, wobei der gesamte Raum zwischen Zellmembran und Vakuolenwand von totem, gekörntem Plasma erfüllt war. Die roten Zellwandfetzen am Schnittrand wurden durch Soda entfärbt. Der Zellsaft blieb im UV-Licht unverändert rot, da Soda durch die Vakuolenwände nicht eindringt und die -inhalte nicht

alkalisch macht. — Das gesamte tote, in der alkalischen Sodalösung suspendierte Plasmagerinnsel fluoresziert lebhaft blaugrün. Einem zweiten Farbbad unterworfen, erfuhr das Plasma bei gewisser Behandlung durch Na_2CO_3 eine Entmischung in lebhaft akridinorötende Tröpfchen und die akridinogrünende Grundmasse. —

Ich habe auch noch die Wirkung des NH_3 auf Innenepidermen, die im UV-Licht „Buntfärbung“ zeigten, untersucht. Am 23. März färbte ich Schnitte von derselben Zwiebel, an der ich am Vortag die früher (S. 607) mitgeteilten Beobachtungen gemacht hatte, in Akridinorange, p_H um 8,0, überführte nach kurzem Auswaschen in 0,8 mol Traubenzucker, in Puffer gelöst, wobei die roten Protoplaste wieder konvex, die gelben und grünen konkav plasmolysierten. Nach 30 Minuten übertrug ich in 0,8 Traubenzucker, in n/100 NH_3 gelöst, und beobachtete die Wirkung des Ammoniaks auf die Zellen. Die roten entfärbten sich rasch wie immer. Die gelben und grünen blieben unverändert. Nach 12—15 Minuten waren in gemischten Arealen die vordem roten Protoplaste grau, die gelben aber noch grellgelb. In orangegelben waren rote Splitterchen im Zellsaft gefällt. Einige von den vordem roten zeigten im Hellfeld mächtig aufgequollene Plasmakappen und Vakuolen, in denen viele Brownsche Körnchen tanzten. Nekrotische Tonoplasten hatten roten Farbstoff angenommen. Die im UV gelb gebliebenen Protoplasten hatten im Hellfeld normalen oder noch fast normalen Plasmawandbelag, nur eben sichtbare Tonoplasten und keine Fällung im Zellsaft.

Nach 20 Minuten ist im UV-Licht die Rotfärbung der Zellsäfte völlig verschwunden, die Gelbfärbung hat im Ammoniak standgehalten. Um die vordem roten, jetzt entfärbten Vakuolen ist das Plasma, das meist schmale Kappen bildet, grün. An den Protoplasten mit im UV gelbem Zellsaft ist die Plasmolyseform noch konkav und es ist nirgends eine Spur von Grünfärbung des Plasmas wahrzunehmen. Auch an denjenigen grellgelben Protoplasten, die jetzt konvex geworden sind, ist Kern und Plasma völlig unsichtbar. — Nach 40 Minuten gibt es Protoplasten mit gelben, leicht orangegelben, grauen und fast ungefärbten Zellsäften; die angrenzenden Zellwände sind neben den gelben ungefärbt, neben den grauen schwach rot, neben den entfärbten intensiv rot, wobei der Farbstoff wie früher (Abb. 7) beschrieben, lokal in den an die Protoplasten grenzenden Zellwandteilen festgehalten ist, die vorherige Rotfärbung der Zellsäfte mit Sicherheit anzeigend. —

Nicht ohne Spannung sah ich den Versuchen entgegen, die die Wirkung des NH_3 auf akridinorangegefärbte Schnitte von der konvexen Außenseite der Zwiebelschuppen prüfen sollten. Ich will die Ergebnisse mitteilen, ohne Einzelbeobachtungen wiederzugeben. Das vitalgefärbte Parenchym reagiert wie die Innenepidermis, die Vakuolen entfärben sich rapid, der rote Farbstoff geht in die Zellwand und noch öfter als dort in die Tonoplastenwölbungen, während die Zellkerne grelleuchtend grün hervortreten. — Ganz anders ist die Wirkung des NH_3 auf die Zellen der unterseitigen Epidermis, die im alkalischen Farbbad behandelt worden sind. In den ersten Minuten ändert sich hier verhältnismäßig wenig. Die zartgrünen Zellen der Innen- und die lebhaften grünen der Außenzone behalten ihre Fluoreszenz, ebenso die grellgrünen Randzellen. Untersuchte ich nach viel längerem Aufenthalt der Schnitte in den NH_3-Fläschchen, so war das beschriebene Randphänomen noch deutlich erhalten. Die Zellsäfte waren nicht entfärbt, ihre Fluoreszenz war geschwächt, aber nicht erloschen. Nur in den Vorpostenzellen und Vakuolenblasen am toten Schnittrand, die die früher geschilderten gelben und gelbroten Farbtöne angenommen hatten, wurde durch das NH_3 der rote Akridinorangeanteil gefällt. — Um die Vorgänge bequemer zu verfolgen, verwandte ich NH_3 in stärkerer Verdünnung: n/250, n/500 und n/1000. Die langsam verfärbenden Vorpostenzellen lassen die polymeren Kationen in Form roter Dendriten ausfallen, während die Zellsäfte der Randreihe und der einschichtigen Schnitteile gelbgrün bzw. grasgrün und frei von Fällungen bleiben. Die Zellen mit im UV-Licht roten Dendriten entsprechen ringsum im Präparat den vorher orangeroten Vorpostenzellen und roten Wundrandtonoplasten. Ein wesentlicher Unterschied gegen Innenepidermis und Parenchym liegt darin, daß der rote Farbstoff in der Außenepidermis niemals in die Membranen der lebenden Zellen verlagert wird.

Das endosmierende NH_3 trennt also auch hier den roten, aus Kationen bestehenden Anteil ab. Die Reaktion lehrt, daß die früher beschriebenen gelbroten und ziegelroten Fluoreszenztöne der Zellsäfte am Wundsaum wirklich als Mischfarben zu deuten sind. — Der leuchtend gelbgrüne Akridinfarbstoff der Vakuolen, in dem wir früher eine Verbindung der Farbbase mit sauren, zelleignen Substanzen vermuteten, wird durch NH_3 primär nicht berührt; die langsam im Laufe von Viertelstunden erfolgende Farbschwächung mag als allmähliche Exosmose freier Farbmoleküle und Verschiebungen des chemischen Gleichgewichts zu verstehen sein.

Wir deuten also das gegensätzliche Verhalten der Innen- und Außenepidermiszellen so, daß der Ammoniak die freien Farbstoffkationen der Innenepidermis rasch fällt[12], während der chemisch gebundene Farbstoff im Zellsaft der lebenden Außenepidermiszellen bei Alkalinisierung aushält und nur einer langsamen Umsetzung unterliegt.

Wie ist dann aber die Reaktion der buntgefärbten Innenepidermen zu deuten? Die Tatsache, daß die Gelbfärbung dem Ammoniak standhält, drängt offenbar zur Vorstellung, daß auch hier im Zellsaft das Akridinorange in irgendeiner chemischen Bindung vorliegt. Dann wäre der Farbunterschied kein bloßer Konzentrationseffekt, wie man nach Strugger (1940f) meinen könnte. Die sattgelb fluoreszierende gelöste Substanz bestünde nicht aus gelben „Ionen", wäre den roten Ionen nicht gleichwertig. Die Verhältnisse bleiben freilich chemisch zu klären. Ist die ausgesprochene Deutung richtig, so darf das Phänomen nicht als „bunte Ionenfärbung" (wie es anfänglich in meinen Protokollen hieß), sondern bloß als „Buntfärbung mit Akridinorange" bezeichnet werden, denn die roten Zellsäfte enthielten dann freie Ionen, die gelben und grünen aber den Farbstoff in einer unbekannten, wohl salzartigen, molekularen Bindung.

Wir kehren zur Fragestellung, von der wir ausgingen, zurück. Daß das Ziel, durch NH_3 die roten (polymeren) Kationen in der Zelle zu gelbgrünen Basenmolekülen umzuwandeln, bei der bisherigen Versuchsanstellung nicht erreicht werden konnte, ist klar. Denn, in die molekulare Form gebracht, exosmiert ja der Akridinfarbstoff aus dem Protoplasten.

Strugger (1940, S. 115) erwähnt im Abschnitt Vakuolenfärbung folgende Beobachtung an Innenepidermen: „Gelegentlich konnte ich in bezug auf die Fluoreszenzfarbe in einzelnen Fällen, bei ganz bestimmten Zwiebeln, deren physiologischer Zustand mir unbekannt blieb, eine Abweichung bei einzelnen Zellen und Zellgruppen beobachten. Während normalerweise die Zellsafträume kupferrot leuchten, fluoreszierten solche Zellsafträume stark grünlich. Ein Konzentrationseffekt scheint nicht vorzuliegen, und es besteht die Annahme wohl zu Recht, daß es sich um Zellen mit stark alkalischem Zellsaft gehandelt hat, in denen der Fluoreszenzindikator Akridinorange seinen Umschlagspunkt überschritten hat. Nähere Beweise für diese Auffassung kann ich nicht erbringen, und es soll einer gesonderten Arbeit mit verschiedenen Fluoreszenzindikatoren vorbehalten bleiben, auf diese Frage einzugehen." — Die Annahme alkalischer Zellsaftreaktion kann nicht richtig

[12] Behandelt man in vitro eine Akridinorange-Lösung 1:100, die im UV kupferrot fluoresziert, mit überschüssigem NH_3, so wird der Großteil des Farbstoffes als rot fluoreszierender Niederschlag ausgefällt, während der in Lösung bleibende Rest die leuchtend gelbgrüne Farbe der Farbbase annimmt.

sein; sonst würde ja der zu Basenmolekülen umgewandelte, permeierfähig gewordene Farbstoff durchs Plasma exosmieren und aus den Zellen verschwinden! Zweifellos haben Strugger Fälle von „Buntfärbung“ der Innenepidermis vorgelegen, die ihm offenbar sonst im Laufe seiner Färbungsstudien mit Akridinorange noch nicht bekannt geworden war.

Der Konkurrenz der Zellenteile kommt bei den Färbungseffekten mit Akridinorange die allergrößte Bedeutung zu. Das gilt für alle Farbbäder über p_H 6,6, wo freie, permeierfähige, elektroneutrale Basenmoleküle vorhanden sind.

Rückschauend lassen sich die diesbezüglichen Beobachtungen etwa dahin zusammenfassen, daß dabei

1. die im UV-Licht rote Zellsaftspeicherung stärker ist als die Membranadsorption, daß

2. die Bindung zu gelbfluoreszierenden, in den Zellsäften der Innenepidermis gelösten Molekülen stärker ist als die Speicherung der roten freien Kationen: letztere läßt ausreichend Farbstoff frei, um Zellkern und Plasma grün fluoreszieren zu lassen, jene bindet den Farbstoff so gründlich, daß die Zellkerne dunkel und fluorochromfrei bleiben.

Ähnliches gilt für die Zellen der Außenepidermen. Die Bindung des Farbstoffs in den Zellsäften, die hier wie bei basischen Hellfeldvitalfarbstoffen (vgl. zumal Drawert 1940) wohl sicher einer chemischen Reaktion mit zelleigenen Substanzen entspricht, läßt für Kern und Plasma keine Spuren von Farbstoff übrig. Ist aber in gleichen, toten Zellen der Zellsaft ausgeflossen, so kommt es sicher zur grünen Adsorptionsfärbung der Kerne. Nur in den völlig toten Schnittrandteilen bleibt im alkalischen Bereich auch für die toten Zellmembranen Farbstoff frei.

3. Die Nukleoli, als lebloses Reserveeiweiß, speichern anders und stärker als das Chromatin und färben sich rot im Inneren grüner Kerne.

V. Quellungs- und Koagulationsnekrosen.

Wir betrachten abschließend die Färbungseffekte an Zellkern und Cytoplasma. Strugger hat die Meinung ausgesprochen, daß die Akridinorangefärbung eine Elektroadsorption an negativ geladenen Eiweißphasen darstellt, und hat durch Kulturversuche mit Mikroorganismen verschiedener Art, die trotz der Kernanfärbung entwicklungsfähig blieben, gezeigt, daß jene streng vital und inturbant verlaufen kann. Hefezellen, Myxomyceten (*Didymium nigripes*) und manche Bakterien (*Bacillus bombycis*) lieferten klare Ergebnisse.

Nach Strugger adsorbieren lebende Zellen wenig Farbstoff und fluoreszieren grün, getötete adsorbieren viel größere Kationenmengen und fluoreszieren, dem Konzentrationseffekt entsprechend, rot. Daß diese neue Lebens- und Todesreaktion in vielen Fällen brauchbar ist, hat Strugger (1940 b, 1943) an zahlreichen Beispielen unter Beweis gestellt. Nur über das Verhalten gewisser Bakterien, zumal grampositiver, sind die Akten noch nicht geschlossen (Gärtner 1943 a, b, Bucherer 1943).

Es bleibt die Frage, wie weit die Farbreaktion auch zur Unterscheidung lebender und toter Zellen*bestandteile* anwendbar ist. Das mitgeteilte Beobachtungsmaterial bringt hier wesentlich Neues.

Übereinstimmend mit Strugger kann ich feststellen, daß alle akridinorötenden Zellkerne und Plasmen sicher tot sind. Sie sind, soweit meine Erfahrung reicht, stets auch im Hellfeld gelb gefärbt, was der seit alters bekannten postmortalen Farbspeicherung entspricht. Lebende Zellkerne färben sich mit Akridinorange grün, in schwächerem Grade vielfach auch lebendes Cytoplasma. Aber nicht jeder akridinogrünende Zellkern von Allium lebt. Dafür sind viele Beispiele erbracht worden. Die toten Zellkerne im sauren c_H-Bereich fluoreszieren viel lebhafter grün als die lebenden. Auch im alkalischen Bereich treten die meisten toten Kerne in grüner Farbe hervor, bei Allium z. B. in den Doppelsaumprotoplasten mit überdauernden Tonoplasten, und die Färbung verstärkt sich wesentlich, wo in den Außenepidermen die Speicherkonkurrenz der den Farbstoff bindenden Zellsäfte wegfällt. Auch völlig tote Zellkerne können also rein grün fluoreszieren. Gleiches gilt für die an sich schwächer anfärbenden Cytoplasmen.

Nicht „tot" und „lebend" wird durch die Akridinorangefärbung unterschieden, sondern die *Art der Nekrose* entscheidet bei den Alliumzellen darüber, ob ein Zellenbestandteil den Farbstoff zu grüner oder roter Fluoreszenzwirkung festlegt. W. Lepeschkin hat in seinem Buche Zellnekrobiose und Protoplasmatod (1937) im Eingang zwei Hauptarten der morphologischen Veränderung der lebenden Materie während der Zellnekrobiose unterschieden; solche, die unter Wasseraufnahme und Verflüssigung, und solche, die unter Koagulation und Erstarrung erfolgen. Vielleicht lassen sich meine Beobachtungen an Zwiebelzellen am besten dahin zusammenfassen, daß *Quellungsnekrosen mit Akridinorange grüne, Koagulationsnekrosen rote Fluoreszenzfärbung annehmen.*

Ich betrachte eine solche verallgemeinerte Fassung nicht als endgültig. Sie soll als Arbeitshypothese dienen. Nachprüfung und einschränkende Präzisierung ist erwünscht.

Meine Erfahrungen scheinen sich aber dem ausgesprochenen Satze wohl zu fügen. Zu den Quellungsnekrosen sind sicher die ausführlich beschriebenen NH_3-Nekrosen zu rechnen, die auch bei stärkster Veränderung der riesenhaft aufgequollenen, im Hellfeld transparenten Zellkerne die typische, rein grüne Fluoreszenzfärbung erhalten. Der Einwand, die Grünfärbung könnte auf mangelnder Farbstoffversorgung beruhen, läßt sich durch Nachfärben der toten Kerne in einem zweiten Farbbad widerlegen. Die typisch „akridinogrünenden" Nekrosen bleiben dabei grün. In Alkalisalzlösung abgestorbene, gequollene Kerne werden grün bei nachträglicher Färbung. Auch der Laugentod in KOH und NaOH (Schindler 1938 a) gibt nach orientierender Untersuchung grünende Kerne, in denen nur der oft in Stücke zerfallende Nukleolus (und möglicherweise auch andere Entmischungsphasen) sich mit Akridinorange röten (Abb. 11). Daß die Nukleoli in

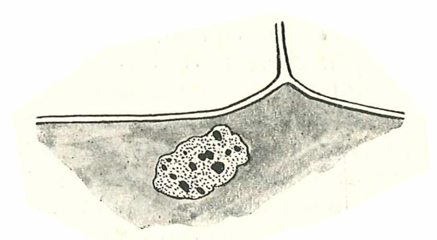


Abb. 11. Zellkern von *Allium cepa*, Außenepidermis, Schnittrand, 24 Stunden in 1/1000 KOH, dann gefärbt.

grünen Kernen sich im Akridinorangebad rot färben, haben schon Bukatsch und Haitinger und Strugger festgestellt. Ich habe es nach NH_3-Behandlung im weiten c_H-Bereich regelmäßig wiedergefunden. — In den durch Schnitt verwundeten Randzellen der Zwiebelpräparate sind die mechanisch koagulierten und geschrumpften Kerne stets akridinorötend, die gequollenen, im Hellfeld transparenten meist grünend oder gilbend. Daß die beim Säuretod, Hitzetod, Alkoholtod erfolgende Koagulation zu akridinorötenden Zuständen führt, hat Strugger gezeigt.

Im Leben fluoresziert das Cytoplasma viel zarter und schwächer als die Kerne. Bei Vakuolenkontraktion nimmt mit der Aufquellung die grüne Fluoreszenzfärbung sprunghaft zu, und sowohl vitale Stadien, wo das Plasma noch strömt, als letal irreversible Folgestadien sind durch starke Blaugrünfluoreszenz ausgezeichnet. Oft erfolgt aber eine Koagulation des Plasmas, während der Kern noch gequollen ist. Dann wird bei neuerlichem

Farbbad in derselben Zelle das Plasma rot, der Kern bleibt rein grün (Abb. 8). Die durch Küster und Strugger bekannten, polar vorschreitenden Nekrobiosen in langgestreckten, einseitig verwundeten Zellen lassen zumal in quellungsfördernden Medien oft abgestufte Fluoreszenztöne im selben Zellumen in Erscheinung treten. Mit Sodalösung erfolgt eine Entmischung des Cytoplasmas in Phasen, von denen die eine akridinorötend, die andere -grünend reagieren kann.

Zusammenfassung.

1. Für Lebermoose werden einige Formen der Trockennekrose beschrieben: Schrumpfnekrose, Kranz-, Rahmen-, Saumnekrose (Abb. 1). Ein typisches Absterbestadium ist durch Zellsäfte, die im UV-Licht nach Akridinorangefärbung gelb fluoreszieren, gekennzeichnet („akridinogilbende Zellsäfte"). Entsprechende Nekrosen finden sich vielfach bei anderen Objekten.

2. Im weiteren bin ich von der Wiederholung und Nachprüfung der Struggerschen Färbeversuche mit Akridinorange in c_H-abgestuften Lösungsreihen ausgegangen. Mit diesem basischen Fluorochrom färben sich an der Innenepidermis von Allium cepa von p_H 3 bis gegen p_H 6,5 nur die Zellwände leuchtend kupferrot, darüber tritt stumpf kupferrote Zellsaftfärbung ein, die hier stets mit Vakuolenkontraktion verbunden ist. Der Umschlagspunkt ist schärfer als beim Neutralrot. Ich fand in Feinreihen die erste Vakuolenfärbung in Bestätigung Struggers bei p_H 6,68/6,60, während schon eine Feinstufe vorher, bei p_H 6,48/6,45 Vakuolenkontraktion einsetzt.

3. Der Mechanismus der Zellsaftspeicherung in Form rot fluoreszierender (wahrscheinlich polymerer) Kationen (vgl. Scheibe) ist so zu verstehen, daß nur nichtdissoziierte, lipoidlösliche Farbmoleküle durch das Plasma permeieren, im sauren Zellsaft dissoziieren und polymerisieren, wodurch dauernd ein Gefälle für die Moleküle erhalten bleibt. Der Speichermechanismus beruht in diesem Falle nicht auf der Bindung an zelleigene Stoffe, sondern bloß auf der Gegenwart saurer Vakuolenräume, die durch für lipoidlösliche Farbmoleküle permeables, für die Ionen aber undurchlässiges Plasma von einem Farbbad niedrigerer Wasserstoffionenkonzentration getrennt sind.

4. Um die Richtigkeit dieser Vorstellung zu prüfen, habe ich gefärbte Allium-Innenepidermen mit NH_3 behandelt. Dieses permeiert, macht die Zellsäfte vital alkalisch und verwandelt damit die Farbkationen in permeationsfähige Moleküle. Diese exosmieren und werden benachbart in Zellmembranen wieder mit

der roten Farbe der Kationen adsorptiv festgelegt. Überträgt man solche Schnitte in Phosphatpuffer ($p_H > 7$), wo das NH_3 exosmiert, so gewinnt der Zellsaft mit der Rückkehr zur natürlich sauren Reaktion sein Speichervermögen wieder: Das Akridinorange kehrt aus den Zellmembranen in den Zellsaft zurück.

5. Anders verhalten sich die Zellen der Außenepidermis der Zwiebelschuppen. Eindringendes Akridinorange wird dort mit zellsafteigenen Stoffen chemisch gebunden, das Reaktionsprodukt fluoresziert grün bis gelb. Am Schnittrand tritt (über p_H 6,6) eine prächtige Zonung mit steigender Intensität der Zellsaftfluoreszenz von Grün über leuchtend Grüngelb nach Gelb auf. Rote Kationenfärbung fehlt in lebenden Zellen.

6. Nur Nekrosen der Wundrandzone — nach K ü s t e r (1926) durch Plasmoschise entstanden, jetzt als Doppelsaumprotoplasten bzw. -plasmolysen bezeichnet (Abb. 2, 3) — und überdauernde Vakuolenblasen zeigen so starke Speicherung, daß nach Absättigung der den Farbstoff bindenden Zellsaftstoffe ein Überschuß an polymeren Kationen bleibt. So entstehen orangegelbe Mischfarben und ziegelrote Farben; sie kennzeichnen die Randnekrosen der Schnitte der Außenepidermis.

7. Die Zellen des Parenchyms der Zwiebelschuppen reagieren ähnlich wie die Innenepidermis, aber ungleichmäßiger im mehrzellschichtigen Schnitt. Der Konzentrationseffekt der Ionenfärbung der Zellsäfte (S t r u g g e r) tritt über p_H 6,6 anschaulich zutage.

8. Das für die Innenepidermis beschriebene Phänomen der „Buntfärbung mit Akridinorange“ beruht wahrscheinlich auf chemischer Bindung eingedrungenen Farbstoffes. Die sattgelb und sattgrün gefärbten Zellsäfte bunter Präparate, die auch niemals Vakuolenkontraktion aufweisen, bleiben, mit NH_3 behandelt, in kürzeren Zeiten unverändert, während rote Zellsäfte rasch entfärbt werden, in orange mischfarbigen der rote Anteil gefällt und gelöst wird.

9. Die relative Speicherung der einzelnen Zellbestandteile hängt weitgehend von Konkurrenzverhältnissen ab. Die elektroneutralen, lipophilen Farbmoleküle permeieren leicht, fast widerstandslos und sind überall zugegen. Die rote Kationenspeicherung im Zellsaft überwiegt die Membranadsorption, die chemische Bindung im Zellsaft erweist sich stärker als die Ionenspeicherung. In der Außenepidermis bleiben die Membranen im lebenden Zellareal ungefärbt, im toten färben sie sich lebhaft rot, auch im alkalischen Bereich.

10. Lebende Zellkerne speichern, wie S t r u g g e r fand, das Akridinorange mit grüner Fluoreszenzfarbe am Chromatingerüst.

In geschädigten und nekrotischen Zellen erscheint die Grünfärbung vielfach sehr verstärkt. Das Cytoplasma in vakuolenkontrahierten Zellen der Innenepidermis fluoresziert minder stark, aber doch sehr deutlich blaugrün. Ionenspeicherung im Zellsaft läßt genug Farbstoff für die vitale Färbung von Kern und Plasma frei; bei chemischer Bindung im Zellsaft bleiben beide, so lange sie leben, in der Regel ungefärbt.

11. Bei NH_3-Einwirkung wird die Grünfluoreszenz der Kerne rapid verstärkt. Auch getötete Kerne leuchten grün. In NH_3-Zuckerlösung treten Kernnekrosen auf, worin die Karyotinphase der Ruhekerne zu einem derbmaschigen grünen Netzwerk entmischt wird, zwischen welchem farblose Lücken ausgespart bleiben. Durch NH_3 verquollene „Riesenkerne" (Abb. 9, 10), die $^1/_4$ bis $^1/_3$ des Zellumens einnehmen, leuchten zur Gänze grün, Karyotin und Karyolymphe sind bei diesen Nekrosen gleichmäßig durchmischt.

12. Das Akridinorange erweist sich als vorzügliches Mittel zur differenzierenden Färbung verschiedenartiger Nekrosen. Nach Strugger nehmen lebende Protoplasten eine grüne, tote durch verstärkte Speicherung eine rote Fluoreszenzfärbung an. Ich bestätige, daß Kern und Plasma im Leben stets grün fluoreszieren, daß beide bei Rotfluoreszenz stets tot sind. Es gibt aber zahlreiche Nekrosen, bei denen Kern oder Plasma im UV-Licht nach Akridinorangefärbung grün leuchten, ja oft lebhaft verstärkte Grünfärbung zeigen. Getötetes Plasma kann also rot oder grün fluoreszieren. — Ich fasse meine Erfahrungen vorläufig dahin zusammen, daß in den Alliumzellen Quellungsnekrosen mit Akridinorange grüne, Koagulationsnekrosen rote Fluoreszenzfärbung annehmen. Tote grünleuchtende Kerne und Plasmen behalten vielfach ihre Färbung bei einem zweiten Farbbad bei. Ich spreche beschreibend von akridinogrünenden und akridinorötenden Nekrosen der Zellenbestandteile.

Nachschrift.

Die erste Fassung der vorstehenden Arbeit war knapp nach dem Abschluß der Versuche niedergeschrieben worden und anfangs August 1944 der Redaktion der Zeitschrift „Protoplasma" zugegangen. Die Drucklegung ist dort nicht mehr über den Fahnensatz hinausgelangt.

Ich habe seither Gelegenheit gehabt, meine Fluorochromierungsstudien sehr zu erweitern, und habe sie vor allem auf zahlreiche pflanzliche Zellsorten ausgedehnt.

Auf Grund des vitalfärberischen Verhaltens ließen sich „v o l l e“ und „l e e r e“ Zellsäfte unterscheiden (H ö f l e r 1946 c, 1947, 1948). Die vollen färben sich mit Akridinorange g r ü n, die leeren r o t im UV-Licht. Die Grünfluoreszenz, die ich an vielen Zellobjekten kennenlernte, ist vom cH-Wert des Farbbades in weiten Grenzen unabhängig und reicht vom alkalischen Ende der Farblösungsreihen bis auf p_H 3 und darunter. Die Rotfluoreszenz der Zellsäfte stellt sich nur bei alkalischer und neutraler Reaktion des Farbbades ein, d. h. oberhalb einer scharf ausgeprägten, bei p_H 6,5—6,2 gelegenen Schwelle. Die Grünfärbung beruht auf chemischer Bindung der eingedrungenen Farbe mit Zellsaftstoffen, die Rotfärbung auf Ionenspeicherung, ohne daß der Farbstoff mit Zellstoffen in chemische Reaktion tritt. Die Innenepidermen der (ruhenden) Zwiebelschuppen waren somit ein erstes Beispiel für leere, die Außenepidermen für volle Zellsäfte gewesen. Bei den Innenepidermen treibender Zwiebeln oder verwundeter Schuppen, welche Buntfärbung mit Akridinorange geben, liegen Zellen mit „vollem“ und „leerem“ Vakuom im Mosaik.

Was die an Zellkernen beobachtete Grünfluoreszenz nach Akridinorangefärbung betrifft, so ist sie bei anderen Objekten (z. B. Orchideenzellen) keineswegs auf Quellungsnekrosen beschränkt, sondern tritt an toten und auch an lebenden Zellkernen allgemein auf. Sie beruht wohl sicher auf chemischer Bindung und nicht, wie S t r u g g e r annehmen zu dürfen glaubt, auf Elektroadsorption des Farbstoffes an der Eiweißphase der lebenden Substanz; wo ich der Annahme S t r u g g e r s im obigen Text noch gefolgt bin, ist dies richtigzustellen.

Das Wundrandphänomen wurde an mehreren anderen Objekten mit „vollen“, akridinogrünenden Zellsäften untersucht. Das beschriebene Verhalten der Zwiebelaußenepidermen, bei denen nur nekrotische Randzellen und isolierte Vakuolenblasen gelbrote oder rote Farbtöne annehmen, ist nicht typisch. Anderwärts finden sich Mischfarben, d. h. von Braungrün über Braungelb nach Orange und Rot abgestufte Fluoreszenztöne in der Randzone auch in lebenden, durchaus intakten Protoplasten (H ö f l e r 1948). Die Vorstellung hat sich aber bestätigt, daß, wenn die ganze den Farbstoff bindende Substanz der „vollen“ Zellsäfte abgesättigt ist, ein Überschuß an Farbstoff im sauren Zellsaft mit der Fluoreszenzfarbe der Kationen in Lösung geht. Bei den Außenhautzellen der Zwiebel sind wohl nur jene bindenden Vakuolensubstanzen so besonders reichlich vorhanden, daß es zur Bildung des Ionenüberschusses in den lebenden Zellen nicht kommt.

Die NH_3-Reaktion hat sich zur Kennzeichnung „voller“ und

„leerer“ Zellsäfte bewährt. Ich konnte mit ihrer Hilfe auch bei Färbungen mit anderen basischen Hellfeld- und Fluoreszenzfarbstoffen die beschriebenen Mechanismen der Farbanreicherung — durch chemische Bindung oder Ionenspeicherung — unterscheiden.

Literatur.

Albach, W., 1928: Zellenphysiologische Untersuchungen über vitale Protoplasmafärbung. Protoplasma 5, 412.

Becker, W. A., 1936: Vitale Cytoplasma- und Kernfärbung. Sammelreferat. Protoplasma 26, 439.

Becquerel, P., 1923: Observations sur la necrobiose du protoplasme végétale avec l'aide d'un nouveau réactif vital. C. r. Acad. Sci. Paris 276, 601.

Biebl, R., 1942: Wirkung der UV-Strahlung auf Allium-Zellen. Protoplasma 36, 491.

— 1942 b: Wirkung der UV-Strahlen auf die Plasmapermeabilität. Protoplasma 37, 1.

Borris, H.: Beiträge zur Kenntnis der Wirkung von Elektrolyten auf die Färbung pflanzlicher Zellmembranen mit Thioninfarbstoffen. Protoplasma 28, 23.

Brauner, L., Zur Frage der postmortalen Farbstoffaufnahme von Pflanzenwänden. Flora 127, 190.

Brooks, S. C. u. Moldenhauer-Brooks, M., 1941: The permeability of living cells. Protoplasma-Monographien, Vol. 19. Berlin.

Bucherer, H., 1943: Experimentelle Untersuchungen über die Fluoreszenzfärbung toter und lebender Bakterien nach Strugger. Zentralbl. f. Bakteriologie usw., II. Abt. 106, 81.

Bukatsch, F., 1940: Einige Anwendungsgebiete der Fluoreszenzmikroskopie. Zeitschr. f. d. ges. Naturwiss. 6, 288.

— und Haitinger, M., 1940: Beiträge zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Zellinhaltes, insbesondere des Cytoplasmas und des Zellkerns. Protoplasma 34, 515.

Collander, R., 1921: Über die Permeabilität pflanzlicher Protoplasten für Sulfosäurefarbstoffe. Jahrb. f. wiss. Bot. 60, 354.

— Turpeinen, O. und Fabritius, E., 1931: Die Permeabilität der Rhoeo-Zellen für Ammoniak und Essigsäure. Protoplasma 13, 348.

— Loenegren, H. und Arhimo, E., 1943: Das Permeationsvermögen eines basischen Farbstoffes, mit demjenigen einiger Anelektrolyte verglichen. Protoplasma 37, 527.

Czaja, A. Th., 1936: Untersuchungen über den Membraneffekt des Absorptionsgewebes und über die Farbstoffaufnahme in die lebende Zelle. Planta 26, 90.

Döring, H., 1935: Versuche über die Aufnahme fluoreszierender Stoffe in lebende Pflanzenzellen. Ber. d. d. bot. Ges. 53, 415.

Drawert, H., 1937: Das Verhalten der einzelnen Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration. Flora 32, 91.

— 1937 b: Der Einfluß organischer Salze auf die Aufnahme und Abgabe von Farbstoffen durch die pflanzliche Zelle. Ber. d. d. bot. Ges. 55, 380

Drawert, H., 1938: Über die Aufnahme und Speicherung von Prune pure durch die pflanzliche Zelle. Planta 29, 179.
— 1938 b: Beiträge zur Entstehung der Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung mit Neutralrot. Ber. d. d. bot. Ges. 56, 123.
— 1939: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. Planta 29, 376.
— 1940: Desgl. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 34, 159.
— 1941: Desgl. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 35, 21.
— und Strugger, S., 1938: Zur Frage der Methylenblauspeicherung in Pflanzenzellen. I. Ber. d. d. bot. Ges. 56, 43.
Etz, K. H., 1939: Über die Wirkung des Austrocknens auf den Inhalt lebender Pflanzenzellen. Protoplasma 34, 421.
Gärtner, K., 1943: Ein Beitrag zur Färbbarkeit der lebenden und toten Bakterienzellen. Gleichzeitig eine Mitteilung über die Bakterienstruktur und deren chemo-therapeutische Beeinflußbarkeit. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten. 125, 86.
Germ, H., 1932: Untersuchungen über die systrophische Inhaltsverlagerung in Pflanzenzellen nach Plasmolyse. I. Protoplasma 14, 566.
— 1933: Desgl. II u. III. Protoplasma 17, 509 u. 18, 260.
Gicklhorn, J., 1932: Intrazelluläre Myelinfiguren und ähnliche Bildungen bei der reversiblen Entmischung des Protoplasmas. Protoplasma 15, 90.
Haitinger, M., 1935: Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie II. Wirkung der Fluorochrome auf pflanzliche Zellen. Beih. Bot. Centr. 53, 378.
— 1938: Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Akad. Verlagsges. Leipzig.
— und Linsbauer, L., 1933: Die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie und ihre Anwendung in der Botanik. Beih. Bot. Centr. 50, 432.
Hartmair, V., 1938: Über Vakuolenkontraktion in Pflanzenzellen. Protoplasma 28, 582.
Henner, J., 1934: Untersuchungen über Spontankontraktion der Vakuolen. Protoplasma 21, 81.
Herzog, Th. und Höfler, K., 1944: Kalkmoosgesellschaften um Golling. Hedwigia 82, 1.
Höfler, K., 1934: Kappenplasmolyse und Salzpermeabilität. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie (Küster-Festschrift) 51, 70.
— 1939 a: Nekroseformen pflanzlicher Zellen. Ber. d. d. bot. Ges. 56, 451.
— 1939 b: Kappenplasmolyse und Ionenantagonismus. Protoplasma 33, 545.
— 1942: Über die Austrocknungsgrenzen des Protoplasmas. Sitzungsanz. Akad. Wiss. Wien. Jg. 1942, Nr. 12 vom 17. Dez.
— 1943: Über die Austrocknungsfähigkeit des Protoplasmas. Ber. d. d. bot. Ges. 60, (94).
— 1943 b: Zellphysiologie und Resistenzforschung (ins Ungarische übersetzt). Botanikai Közlemenyek 60, 207.
— 1946 a: Über Trockenhärtung und Härtungsgrenzen des Protoplasmas einiger Lebermoose. Sitzungsanz. Akad. Wiss. Wien. Jg. 1945, Nr. 3 vom 8. März.
— 1946 b: Über den isoelektrischen Punkt natürlicher Zellulosemembranen und deren Färbbarkeit mit Fluorochromen. Ebenda, Jg. 1946, Nr. 7 vom 6. April.

Höfler, K., 1946 c: Sur la coloration vitale des vacuoles par l'orange d'acridine et le rouge neutre. Compt. rend. Ac. Sc. Paris 223, Nr. 7, 335.
— 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.
1948: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Mikroskopie, Sonderheft Fluoreszenzmikroskopie (Haitinger-Denkheft).
— und Pecksieder, E., 1947: Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an höheren Pilzen. Österr. Bot. Zeitschr. 94, 99.
— und Stiegler, A., 1947: Cresylechtviolett als Vitalfarbstoff. Mikroskopie 2, 250.
Hofmeister, L., 1938: Studien über die Permeabilität vital gefärbter Pflanzenzellen. I. Versuche mit Neutralrot und Methylenblau. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 55, 393.
Houska, H., 1939, Zur protoplasmatischen Anatomie der Küchenzwiebel. Österr. bot. Zeitschr. 88, 161.
Iljin, W. S., 1932: Desiccation and decay of the cells of the red cabbage. Preslia 11.
— 1933: Über Absterben der Pflanzengewebe durch Austrocknung und über ihre Bewahrung vor dem Trockentod. Protoplasma 19, 414.
Irwin, M., 1923: The penetration of dyes as influenced by hydrogen ion concentration. Journ. Gen. Physiol. 5, 727.
— 1925: Accumulation of brilliant cresyl blue in the sap of living cells of Nitella in the presence of NH_3. Journ. Gen. Physiol. 9, 235.
Jungers, V., 1934: Die Verlagerungsfähigkeit des Zellinhaltes der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* durch Zentrifugierung. Protoplasma 21, 351.
Kamija, N., 1939: Cytomorphologische Plasmolysestudien an *Allium*-Epidermen. Protoplasma 32, 373.
Kersting, F., 1937: Über Adsorption von Farbstoffen an Zellwänden und ihre Verdrängung durch anorganische Salze. Ber. d. d. bot. Ges. 55, 329.
Kressin, G., 1935: Beiträge zur vergleichenden Protoplasmatik der Mooszelle. Dissertation. Greifswald.
Kunze, R., 1930: Der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf die Bildung der Vakuolenkontraktion vitalgefärbter *Elodea*-Zellen. Protoplasma 12, 161.
Küster, E., 1898: Zur Kenntnis der Bierhefe. Biolog. Zentralbl. 18, 305.
— 1910: Über Inhaltsverlagerungen in plasmolysierten Zellen. Flora 100, 267.
— 1911: Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen. Jahrb. f. wiss. Bot. 50, 261.
1918 a: Über Vakuolenteilung und grobschaumige Protoplasten. Ber. d. d. bot. Ges. 36, 283.
— 1918 b: Über die Vitalfärbung der Pflanzenzellen. I. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 35, 95.
— 1926: Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. Protoplasma 1, 73.
1929: Beobachtungen an verwundeten Zellen. Protoplasma 7, 150.
— 1933: Über Färbung lebenden Protoplasmas von Pflanzenzellen mit Prune pure. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 50, 409.
1938: Über *Hyacinthus*, ein neues, zur Untersuchung der Vakuolenkontraktion geeignetes Objekt. Ebenda 55, 26.
— 1941: Über Plasmolyse- und Deplasmolyseformen pflanzlicher Protoplasten. Protoplasma 36, 134.
— 1942: Vitalfärbung und Vakuolenkontraktion. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 58, 245.

Lederer, B., 1935: Färbung, Fixierung und Mikrodissektion von Tonoplasten. Biologia generalis 11, 211.
— 1935 b: Färbungs-, Fixierungs- und mikrochirurgische Studien an *Spirogyra*-Tonoplasten. Protoplasma 22, 405.
Lepeschkin, W. W., 1925: Untersuchungen über das Protoplasma der Infusorien, Foraminiferen und Radiolarien. Biologia generalis 1, 368.
— 1937: Zell-Nekrobiose und Protoplasma-Tod. Protoplasma Monographien 12. Berlin.
— 1943: Zur Kenntnis des Absterbens der Hefe beim Austrocknen. Protoplasma 37, 404.
McCutcheon, M., and Lucké, B., 1924: The mechanism of vital staining with basic dyes. Journ. Gen. Physiol. 6, 501.
Pekarek, J., 1938: Über die Wirkung von Nitraten auf die Färbung pflanzlicher Zellmembranen und Zellsäfte mit Azur I. Protoplasma 30, 161.
— und Fürth, R., 1931: Über die Richtung der Protoplasmaströmung in benachbarten *Elodea*-Blattzellen. Protoplasma 13, 666.
Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Unters. Botan. Institut Tübingen 2, 179.
Plaß, H., 1942: Zur Pathologie der Diatomeenplastiden. II. Aufquellung durch Ammoniak. Protoplasma 37, 189.
Rehm, S., 1938: Die Wirkung von Elektrolyten auf die Aufnahme saurer und basischer Farbstoffe durch die Pflanzenzelle. Planta 28, 359.
Rhumbler, L., 1893: Eine Doppelfärbung zur Unterscheidung lebender Substanzen. Zool. Anzeiger 16, 47.
Ruhland, W., 1912: Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. Jahrb. f. wiss. Bot. 51, 376.
Růžička, V. L., 1904: Über tinctorielle Differenzen zwischen lebendem und abgestorbenem Protoplasma. Arch. ges. Physiol. 107, 497.
Schaede, R., 1923: Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarben. Jahrb. f. wiss. Bot. 62, 65.
Scheibe, G., 1938: Reversible Polymerisation als Ursache neuartiger Absorptionsbanden von Farbstoffen. Kolloid-Zeitschr. 82.
— 1939: Die reversible Polymerisation von Farbstoffen, ein Zustand mit neuen Eigenschaften. Ber. d. physik. mediz. Ges. Würzburg 63, 15.
1941: Lichtabsorption und Energiefortleitung bei lockeren Komplexen organischer Farbstoffe. Zeitschr. f. Elektrochemie 47, 73.
— Mareis, A., und Ecker, H., 1937: Über reversible Polymerisation als Ursache neuartiger Absorptionsbanden (III). Naturwissenschaften 25, 475.
Schindler, H., 1938: Tötungsart und Absterbebild. I. Der Alkalitod der Pflanzenzelle. Protoplasma 30, 186.
— 1938: Desgl. II. Der Säuretod der Pflanzenzelle. Protoplasma 30, 547.
— (1944): Protoplasmatod durch Schwermetallsalze. I. Kupfersalze. Protoplasma 38, 225.
— (1944): Desgl. II. Kobalt- und Nickelsalze. Protoplasma 38, 245.
Schönleber, K., 1936: Über Prune pure und seine Verwendung als Protoplasma-Vitalfärbemittel. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 53, 303.
Strugger, S., 1935: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Berlin.
— 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 26, 56.
— 1938 a: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora 132, 253.

Strugger, S., 1938b: Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6G. Protoplasma 30, 85.
— 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss. 73, 97.
— 1940b: Die Kultur von *Didymium nigripes* aus Myxamöben mit vitalgefärbtem Plasma und Zellkernen. Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 57, 415.
— 1940c: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 44, 601.
— 1941, Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. I. Basische, zweifarbige Indikatoren. Flora 35, 101.
1943: Untersuchungen über die vitale Fluorochromierung der Hefezelle. Flora 37, 73.
— und Hilbrich, P., 1942: Die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Bakterienzellen mit Hilfe der Akridinorangefärbung. Deutsche Tierärztl. Wochenschr. 50, 1.
De Vries, H., 1871: Sur la perméabilité du protoplasme des betteraves rouges. Arch. Néerland 6, 117. (Opera collata 1, 86.)
Weber, F., 1921: Das Fadenziehen und die Viskosität des Protoplasmas. Österr. bot. Zeitschr. 70, 172.
— 1930: Vakuolenkontraktion vital gefärbter *Elodea*-Zellen. Protoplasma 9, 106.
Wulff, H. D., 1934: Lebendfärbungen mit Chrysoidin. Planta 22, 70.